



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Departamento de Biología Molecular**

**Nanotecnología y microbicidas:  
protección frente a la infección por VIH**

**TESIS DOCTORAL**

**Javier Sánchez Rodríguez**

**Madrid, 2012**

Directores de Tesis:

Dra. : María Ángeles Muñoz Fernández

Dr.: José Luis Jiménez Fuentes

Esta Tesis ha sido realizada en el laboratorio de:

Inmuno-Biología Molecular

**Hospital General Universitario Gregorio Marañón**

Esta Memoria ha sido realizada en el laboratorio de Inmuno-Biología Molecular del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, bajo la dirección de la Doctora María Ángeles Muñoz Fernández y el Doctor José Luis Jiménez Fuentes. El trabajo de investigación que constituye esta Memoria ha sido realizado gracias a la financiación concedida por el “Fondo de Investigaciones Sanitarias” del Instituto de Salud Carlos III con números de expediente PI081495 y PI11/00888.

Diseño y realización de la portada de la Tesis Doctoral: Samuel Vítili Cohen Kellner



Hospital General Universitario  
Gregorio Marañón



La Doctora María Ángeles Muñoz Fernández, Jefe de Sección Médica del Servicio de Inmunología y Jefa/IP del Laboratorio Inmuno-Biología Molecular, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, y el Doctor José Luis Jimenez Fuentes, IP de Proyecto PI11/00888, Laboratorio Inmuno-Biología Molecular, Hospital General Universitario Gregorio Marañón.

#### CERTIFICAN:

Que el trabajo de investigación correspondiente a la Tesis Doctoral titulada: “Nanotecnología y microbicidas: protección frente a la infección por VIH” ha sido realizada por Javier Sánchez Rodríguez, bajo su dirección. Revisado el trabajo, los que suscriben consideran éste como satisfactorio y autorizan su presentación y defensa para ser juzgado.

Madrid, 3 de Septiembre de 2012.

Fdo. Dra. M<sup>a</sup> Ángeles Muñoz Fernández

Fdo. Dr. José Luis Jiménez Fuentes



*“Una breve mirada a la historia nos recuerda las líneas de tiempo del pasado. Mi experiencia me ha demostrado que las cosas que esperamos que sucedan, siempre suceden más lentamente. Con los inventos, continuamente subestimamos el tiempo requerido desde la idea, hasta su plena realización. Los nuevos campos de la biotecnología y la nanotecnología serán el desarrollo del siglo XXI.*

*Se trata de las sorpresas que nos abruman, como el sida y los ataques terroristas del 11 de septiembre de 2001. Al igual que con la especie humana y otras manifestaciones de la naturaleza, casi todo cambio es evolutivo, no revolucionario. Las cosas simplemente se toman su tiempo - casi siempre más tiempo del que esperamos”. John Naisbitt*

*A mi abuela y a mi madre, que me lo han dado todo*



## ***AGRADECIMIENTOS***

# AGRADECIMIENTOS



En primer lugar, agradecer a María Ángeles y José Luis la oportunidad que me brindaron hace ya casi cuatro años, para completar esta etapa de mi vida.

M<sup>a</sup> Ángeles, gracias por todo tu apoyo y tu esfuerzo. Por animarme a continuar y siempre decirme *“tranquilo, que ya verás como sale”*. Bendita paciencia la tuya.

José, muchas gracias por darme la posibilidad de trabajar a tu lado y ayudarme cuando lo necesité.

Gracias a todo el grupo de la funda, fuisteis los primeros en ver mis pasos, en enseñarme todo lo que sabíais y sobretodo en aguantar mis preguntas enredosas. Gracias Jon, por ser el primero que me abrió el camino en esto de la ciencia (*¿Seguro?... ¡Sí Javi, seguro!*). Gracias Elsa, Van, Avo y Alberto por enseñarme a manejar ratones... Alberto, ¿cómo era eso de aspirar ratones? Gracias Eva, Cris y Conchi por aguantar cuando en pleno invierno abría la ventana del labo. Gracias Bea por no haberme dado a probar tus collejas. Gracias al resto, Vir, Charli, Belén, Irene, Sara, Ángel, Alfonso, Félix, Vero, Julio y Alfi, por todos esos momentos que hemos reído y seguro seguiremos riendo.

Gracias a la gente del Gregorio, por todo lo que me habéis enseñado. Gracias Laura, por ser más que una compañera, por ser mi apoyo en el labo durante todo este tiempo. Gracias Susana y Chusa por hacer todo lo posible porque las cosas salieran adelante. Gracias Raquel por tu ayuda en la recta final. Gracias Quique, siempre me has hecho todo más fácil y siempre que lo he necesitado, he tenido tu ayuda... ¿a ver cuándo hacemos otra porra no?

Miguel, gracias por ayudarme y lo que es más importante, enseñarme a tocar tanta vagina... ahora bien, de ratonas. No, en serio, gracias por hacerme participe de tus conocimientos y ofrecerte siempre para cualquier ayuda.

Judith, Marjorie y Rafa Correa, gracias por echarme una mano cuando la necesité con las PCR y con otras tantas cosas. Gracias Teresa por compartir esos meses de sándwich conmigo, menudos marujeos. Gracias a mi gente del Biobanco, a Isa, Coral, Almu, Irene C. y

Jorge, trabajar a vuestro lado a hecho todo más llevadero a lo largo de estos años de tesis. Y sí chicas, aunque no lo creáis, se oye todo.

Gracias Ricardo por toda tu ayuda y aportaciones durante el tiempo que coincidimos. Gracias Irene L. por querer facilitarnos siempre el trabajo. Gracias Santi por todos esos seminarios que con tanto cariño nos das. Rafa Gras, sin ti las comidas no hubieran sido tan entretenidas, gracias por ello. Gracias Marta, Verónica, Sandra, Didiana y Talia por los buenos momentos y por toda vuestra ayuda y consejos. Gracias a las nuevas incorporaciones, a Regina y los chicos del máster, Sandra, Mauriel y Hugo. Gracias al resto, a Louis, Mabela, Luís López, Maribel, Almudena, Alberto, Lola García, Lola Gurbindo, Alicia, Nick, Nati, Carmen, Claudia, Pepa por haber sacado siempre un momento para resolverme cualquier duda.

Tampoco me puedo olvidar de la gente de Alcalá, a Javi, a Rafa y a todo su laboratorio, y en especial a Sandra, mi compañera de suplicios en Atenas, muchas gracias por toda tu ayuda con la parte química.

Gracias a mi gente por todo este tiempo que me habéis apoyado y dado el mejor de vuestros consejos cuando ha hecho falta. Angelillo gracias porque sé, que siempre vas a estar ahí. Gracias Carlos, Andrés, Marcos, Franz, Kike, Guille y Alf, vuestra amistad no tiene precio. Gracias a la gente del barrio (Chino, Manu, Vito, Fernis, Rubén y Rapas) por hacerme pasar buenos momentos.

Gracias a mi familia, a mis tíos, mis primos por estar siempre ahí.

Gracias a Alfonso y a mi madre, porque sin vuestro esfuerzo, nada de esto hubiera sido posible. Gracias a vosotros y a María, habéis hecho posible que llegara a esta etapa de mi vida.

Sara, gracias por estar a mi lado este tiempo, y haber conseguido que alzara la cabeza y mirara para adelante con valentía.

Habrà muchas y muchos más que habéis formado parte de esto, que alguna vez habréis pasado por mi vida y que con vuestro granito de arena habéis hecho esto posible... gracias.

***ÍNDICE***





# ÍNDICE



<b>ÍNDICE</b>	17
<b>ABREVIATURAS</b>	23
<b>SUMMARY</b>	27
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	31
<b>1.1 Virus de la inmunodeficiencia humana</b>	31
<b>1.1.1 Estructura del virus de la inmunodeficiencia humana</b>	33
<b>1.1.2 Ciclo de infección del VIH</b>	33
<b>1.1.3 Invasión del VIH en el tracto genital femenino</b>	36
<b>1.1.4 Invasión del VIH en el tracto genital masculino</b>	41
<b>1.2 Nanomedicina y VIH</b>	42
<b>1.2.1 Dendrímeros y VIH</b>	46
<b>1.2.2 Microbicidas frente al VIH</b>	47
<b>1.2.2.1 Inhibidores de la transcriptasa inversa</b>	48
<b>1.2.2.2 Surfactantes</b>	50
<b>1.2.2.3 Protectores de la flora vaginal</b>	51
<b>1.2.2.4 Inhibidores de la entrada</b>	52
<b>2. OBJETIVOS</b>	59
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	63
<b>3.1 Células</b>	63
<b>3.2 Obtención de virus</b>	65
<b>3.3 Aislado viral de individuos VIH+</b>	66
<b>3.4 Cuantificación del antígeno p24<sup>gag</sup></b>	66
<b>3.5 Ligandos polianiónicos y dendrímeros de estructura carboxilato aniónicos</b>	67
<b>3.6 Reactivos</b>	70
<b>3.7 Estudio de toxicidad</b>	71
<b>3.7.1 Ensayos de reducción de sales de tetrazolio</b>	71
<b>3.7.2 Marcaje con 7AAD</b>	72
<b>3.7.3 Ensayo de liberación de lactato deshidrogenasa</b>	72

<b>3.7.4 Ensayo de hemólisis</b>	73
<b>3.8 Evaluación de la toxicidad sobre la movilidad espermática</b>	73
<b>3.9 Experimentos</b>	74
<b>3.9.1 Infección celular</b>	74
<b>3.9.1.1 Experimentos de pre-tratamiento</b>	74
<b>3.9.1.2 Experimentos de post-tratamiento</b>	75
<b>3.9.1.3 Experimentos de internalización del virus</b>	75
<b>3.9.2 Inhibición de la transmisión viral a través de monocapa</b>	75
<b>3.9.3 Inactivación del VIH-1 mediada por los dendrímeros</b>	76
<b>3.9.4 Combinación con antivirales de gran actividad</b>	76
<b>3.10 Citometría de flujo</b>	76
<b>3.11 Determinación de la actividad bactericida de los dendrímeros</b>	77
<b>3.12 Efecto de los dendrímeros sobre el epitelio vaginal de ratonas</b>	78
<b>3.14 Modelado computacional</b>	79
<b>3.15 Análisis estadístico</b>	81
<b>4. RESULTADOS</b>	85
<b>4.1 Efecto de los dendrímeros aniónicos 2G-C16 y 2G-S16 en la inhibición de la transmisión del VIH-1</b>	85
<b>4.1.1 Estudio de toxicidad</b>	86
<b>4.1.2 Ensayos de inhibición del VIH-1</b>	88
<b>4.1.3 Ensayos de inactivación viral mediada por los dendrímeros 2G-C16 y 2G-S16</b>	93
<b>4.1.4 Ensayo de modelado computacional</b>	94
<b>4.1.5 Ensayo de infectividad mediada por los dendrímeros 2G-C16 y 2G-S16</b>	96
<b>4.1.6 Estudio de los receptores y correceptores celulares en CMSP</b>	97
<b>4.1.7 Estudio de la activación celular en CMSP</b>	98
<b>4.1.8 Evaluación de los dendrímeros en vaginas de ratonas CD-1a</b>	98
<b>4.1.9 Determinación de la actividad bactericida de los dendrímeros 2G-C16 y 2G-S16</b>	101
<b>4.1.10 Evaluación de la toxicidad de 2G-C16 y 2G-S16 sobre la movilidad espermática por VIH-1</b>	101
<b>4.1.11 Efecto de la combinación de ambos dendrímeros 2G-C16 y 2G-S16 en la infección por VIH-1</b>	102
<b>4.1.12 Efecto de la combinación del dendrímero 2G-S16 con antivirales de gran actividad en la infección por VIH-1</b>	105
<b>4.2 Ligandos polianiónicos</b>	107
<b>4.2.1 Estudio de biocompatibilidad</b>	108

4.2.2 Ensayos de inhibición del VIH-1	109
4.3 Métalo-dendrimeros carbosilano aniónicos	112
4.3.1 Estudio de biocompatibilidad	113
4.3.2 Ensayos de inhibición del VIH-1	115
4.4 Dendrimeros polifenólicos y de síntesis tiol-eno	117
4.4.1 Estudio de biocompatibilidad	119
4.4.2 Ensayos de inhibición del VIH-1	120
4.4.3 Ensayos de inhibición del VIH aislado de individuos VIH+	123
4.4.4 Inhibición de la transmisión viral a través de monocapa	124
4.4.5 Estudio de los receptores y correceptores celulares en CMSP	127
4.4.6 Estudio de la activación celular en CMSP	129
4.4.7 Ensayo de modelado computacional	130
4.4.8 Evaluación de los dendrimeros en vaginas de ratonas CD-1a	131
4.4.9 Efecto del pH en la actividad de los dendrimeros	134
5. DISCUSIÓN	137
6. CONCLUSIONES	153
7. ANEXOS	157
8. BIBLIOGRAFÍA	197



## ***ABREVIATURAS***



# ABREVIATURAS



- 7AAD:** 7-Aminoactinomycin D
- ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- AMD:** AMD3100 (antagonista del correceptor CXCR4)
- ARN:** Ácido ribonucleico
- ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero
- ARNi:** Ácido ribonucleico de interferencia
- AZT:** Zidovudina (Inhibidor de la retrotranscriptasa inversa)
- CMSP:** Células Mononucleares de Sangre Periférica
- Co:** Cobalto
- Cu:** Cobre
- DMSO:** Dimetil Sulfóxido
- Dxt:** Dextrano
- EFV:** Efavirenz (Inhibidor de la retrotranscriptasa)
- ELISA:** Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)
- ETS:** Enfermedades de Transmisión Sexual
- FDA:** Food and Drug Administration (Agencia de Drogas y Alimentos)
- IL-2:** Interleuquina 2
- IMPE:** Índice de Movilidad Progresiva Espermática
- ITINN:** Inhibidores de la Transcriptasa Inversa No análogos de Nucleósido
- LDH:** Lactato dehidrogenasa
- LTR:** Long Terminal Repeat (repetición terminal larga)
- MTS y MTT :** 3-(4, 5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
- MVC:** Maraviroc (antagonista del correceptor CCR5)
- Ni:** Níquel
- OMS:** Organización Mundial de la Salud
- Onusida:** Programa Conjunto de Naciones Unidas sobre el VIH/sida
- PBS:** Phosphate buffered saline (Buffer Fosfato Salino)
- PHA:** Phytohaemagglutinin (Fitoheماغلوتينina)
- PMS:** Phenazine Methosulfate (Metosulfato de Fenazina)
- REM:** Recuperación de Espermatozoides Móviles

**RMN:** Resonancia Magnética Nuclear

**RT:** Retrotranscriptasa Inversa

**SHIV:** Simian-Human Immunodeficiency Virus (Virus quimérico de la Inmunodeficiencia Humana-Simia)

**Sida:** Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida

**SIV:** Simian Immunodeficiency Virus (Virus de la inmunodeficiencia Simia)

**Sur:** Suramin

**T-20:** Fuzeón

**TA:** Temperatua Ambiente

**TAK:** TAK-779 (antagonista del correceptor CCR5)

**TARGA:** Terapia Antirretroviral de Gran Actividad

**TDF:** Tenofovir (Inhibidor de la retrotranscriptasa inversa)

**TER:** Transepithelial Electrical

**UI:** Unidades Internacionales

**VHS:** Virus Herpes Simple

**VIH:** Virus de la Inmunodeficiencia Humana

**Zn:** Zinc



***SUMMARY***



## SUMMARY



The concept of “microbicide” has been born out of the unavailability of a vaccine against HIV and the problems of women to negotiate the use of preventive prophylaxis by their partners, especially developing countries.

We have developed and evaluated anionic carbosilano dendrimers 2G-S16, 2G-C16, 2G-S16Cu8, 2G-C16Cu2, 2G-C16Cu4, 2G-C16Cu6, 2G-S32, 2G-C32, 2G-S24P and 2G-C24P non-specific microbicides. Moreover, we described for the first time the combination of non-specific compounds 2G-S16 and 2G-C16 and the antiretroviral drugs as potential anti-HIV microbicides.

All dendrimers showed high biosafety in human epithelial cell lines derived from uterus and vagina and in primary blood human cells (PBMC). The majority of the dendrimers combination or the combination dendrimer+antiretroviral, not only have a greater capacity to block the entry of different X4 and R5 HIV-1 isolates inside epithelial cells but protect the epithelial monolayer from the disruption or and also prevents HIV-1 infection of activated PBMC. The treatment of epithelial cells with different carbosilane dendrimers did not produce changes in activation or proliferation of PBMC, expression of CD4, CCR5 or CXCR4, or microbiote and sperm survival. Moreover, no irritation or vaginal lesions were detected in female CD-1a mice after dendrímero vaginal administration. Finally, all 2G-S16 or 2G-C16-antiretroviral combinations showed a synergistic profile with improved antiviral potency.



## ***I. INTRODUCCIÓN***



# 1. INTRODUCCIÓN



## 1.1 Virus de la inmunodeficiencia humana

En el año 1981 se observó un cuadro de síntomas comunes (neumonía por *P. jiroveci*, sarcoma de Kaposi, tuberculosis, candidiasis e infección por citomegalovirus) en homosexuales, que pronto empezaron a aparecer en varones o mujeres heterosexuales usuarios de drogas intravenosas y entre individuos hemofílicos que habían recibido transfusiones de sangre o de productos sanguíneos al que se denominó síndrome de inmunodeficiencia humana o sida.<sup>1</sup> El Programa Conjunto de Naciones Unidas sobre el VIH/sida (Onusida) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) estiman que el sida ha causado la muerte de aproximadamente 25 millones de personas en todo el mundo.

En 1984, se descubrió el agente viral causante de la enfermedad, al que se le denominó virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1).<sup>2</sup> En 1986 se aisló en África Occidental el VIH-2.<sup>3-5</sup> Como otros agentes causantes de enfermedades infecciosas emergentes, el VIH pasó a los seres humanos por zoonosis. El VIH tiene una alta homología con el virus de inmunodeficiencia de los simios (SIV), del que se conocen diversas cepas que se transmiten por vía sexual.<sup>6</sup>

A diferencia del VIH, el SIV no causa inmunodeficiencia en los organismos que lo hospedan, salvo en el caso del salto de una especie a otra. El VIH-1 está estrechamente relacionado con el SIV<sub>cpz</sub>, que infecta a poblaciones de la subespecie centroafricana del chimpancé común (*Pan troglodytes troglodytes*) con una homología de secuencia del 84%. El VIH-2, extendido en África Occidental, procede del SIV<sub>sm</sub>, propio del mangabey fuliginoso (*Cercocebus atys atys*) que habita las selvas costeras desde Senegal hasta Costa de Marfil con una homología del 82-89%.<sup>6-7</sup> Por lo tanto, existen importantes diferencias entre el VIH-1 y el VIH-2, lo que provoca cambios en su evolución, tropismo y patogénesis. Las principales diferencias incluyen una menor patogenicidad del VIH-2 comparada con el VIH-1, un mayor control inmunológico de la infección por el VIH-2 y a veces un cierto grado de independencia del receptor CD4.<sup>3</sup>

En concreto, el VIH-2 se transmite de forma más lenta y es por lo general menos patogénico que el VIH-1, con periodos de latencia de más de 10 años, mostrando un índice de mortalidad dos tercios menor que el VIH-1. Además, el VIH-2 se encuentra confinado casi exclusivamente a los países de África occidental.<sup>3</sup>

La infección por el VIH, afecta aproximadamente a 33,3 millones de personas alrededor de todo el mundo, de los cuales 2,2 millones son menores de 15 años de edad.<sup>8</sup> Más de 7.000 personas se infectan diariamente por el VIH según los datos de Onusida. La exposición heterosexual constituye la principal vía de transmisión del virus en África subsahariana, y representa el 80% de las nuevas infecciones en todo el mundo.<sup>9</sup> En los países en los que las epidemias se encuentran en fase de madurez, los contagios en personas con parejas estables y duraderas a menudo son elevados (Onusida).

Además, muchas veces, los hombres y las mujeres no pueden compartir la responsabilidad de reducir los riesgos de la transmisión del VIH, en parte porque las mujeres están excluidas de la toma de decisiones relacionadas con la sexualidad, no reciben una educación sexual en profundidad, y tienen un acceso desigual a los métodos de prevención. La epidemia afecta a los hombres que tienen relaciones sexuales con hombres, los usuarios de drogas por vía parenteral, y los profesionales del sexo en todo el mundo, pero sobre todo en Asia y el Pacífico, América Latina y el Caribe, y Europa oriental y central. Debido a la terapia de alta eficacia o TARGA, en todo el mundo millones de personas seropositivas viven más y en mejores condiciones, lo que supone un gran éxito que se ha de preservar y ampliar (Onusida).

El TARGA o combinación de al menos tres antirretrovirales, dos de ellos de dos familias diferentes es el tratamiento convencional para el VIH/sida.<sup>10</sup> Aunque el TARGA disminuye la carga viral a niveles indetectables, incrementa los valores de linfocitos T CD4+ y evita la progresión a sida, todavía hay varios desafíos pendientes. La mayor dificultad radica en la no adhesión del paciente al tratamiento y por lo tanto del fracaso virológico.<sup>11-14</sup> Aunque el individuo VIH+ tenga una adherencia >90% al TARGA, el VIH puede desarrollar resistencias a determinadas combinaciones de fármacos.

Además, hay que destacar los efectos secundarios debidos a la toxicidad del TARGA como son efectos cardiológicos, diabetes, enfermedad hepática, cáncer, lipodistrofia y envejecimiento acelerado entre otras.<sup>15-17</sup> El TARGA no erradica el VIH en los pacientes



infectados y el virus permanece de forma latente de por vida en los reservorios celulares y anatómicos.<sup>18-19</sup> Más importante, no existe una vacuna preventiva frente a la infección por el VIH por lo cual se han puesto en marcha nuevas aproximaciones terapéuticas con el objetivo de evitar la transmisión sexual del VIH como es el desarrollo de microbicidas.

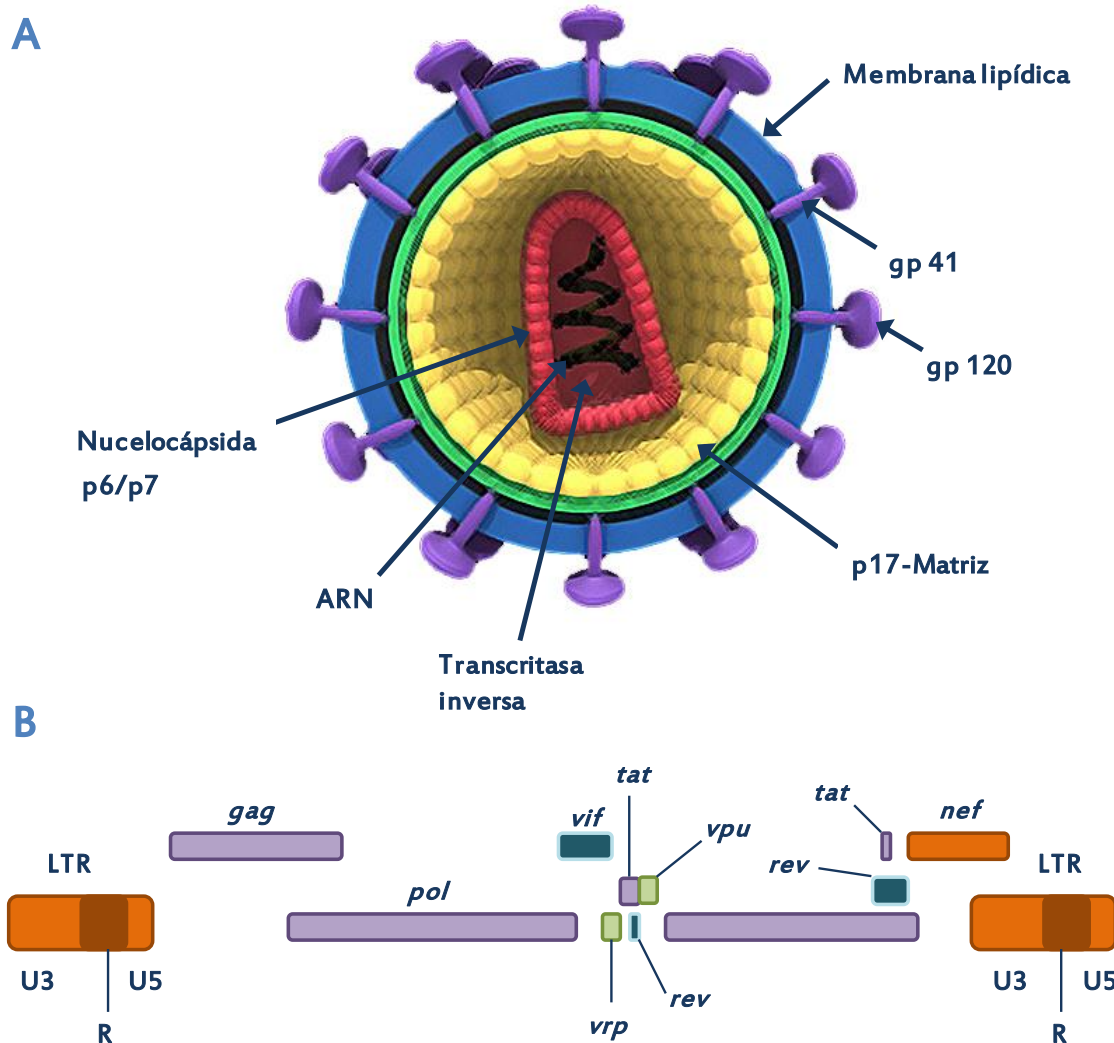
### **1.1.1 Estructura del virus de la inmunodeficiencia humana**

La partícula viral del VIH es de aproximadamente 100 nm de diámetro, se compone de una envoltura lipídica y una nucleocápsida de forma cónica, en cuyo interior se encuentra el material genético y las enzimas necesarias para el ciclo viral.<sup>20</sup>

La envoltura está formada por una bicapa fosfolipídica. Asociada a la bicapa hay dos glicoproteínas virales: gp120, proteína trimérica que sobresale hacia el exterior y permanece unida no covalentemente a la proteína gp41 que se encuentra anclada a la bicapa fosfolipídica por una región transmembrana. En la parte interna de la membrana se encuentra la proteína p17. La proteína de la cápsida p24, es el componente principal del núcleo, y recubre la nucleocápsida. Ésta contiene dos copias del genoma viral que están recubiertas por la proteína p9, una molécula de ARN transferente que actúa como cebador en la iniciación de la síntesis del ADN viral, la transcriptasa inversa, la proteasa y la proteína p6.<sup>21</sup> El ARN viral tiene una longitud de 9,2 Kb y comprende las secuencias repetidas situadas en los extremos del genoma (LTR) y nueve genes: seis reguladores (tat, rev, ref, vif, vpr y vpu) y tres estructurales (gag, pol y env) (**Figura 1**).

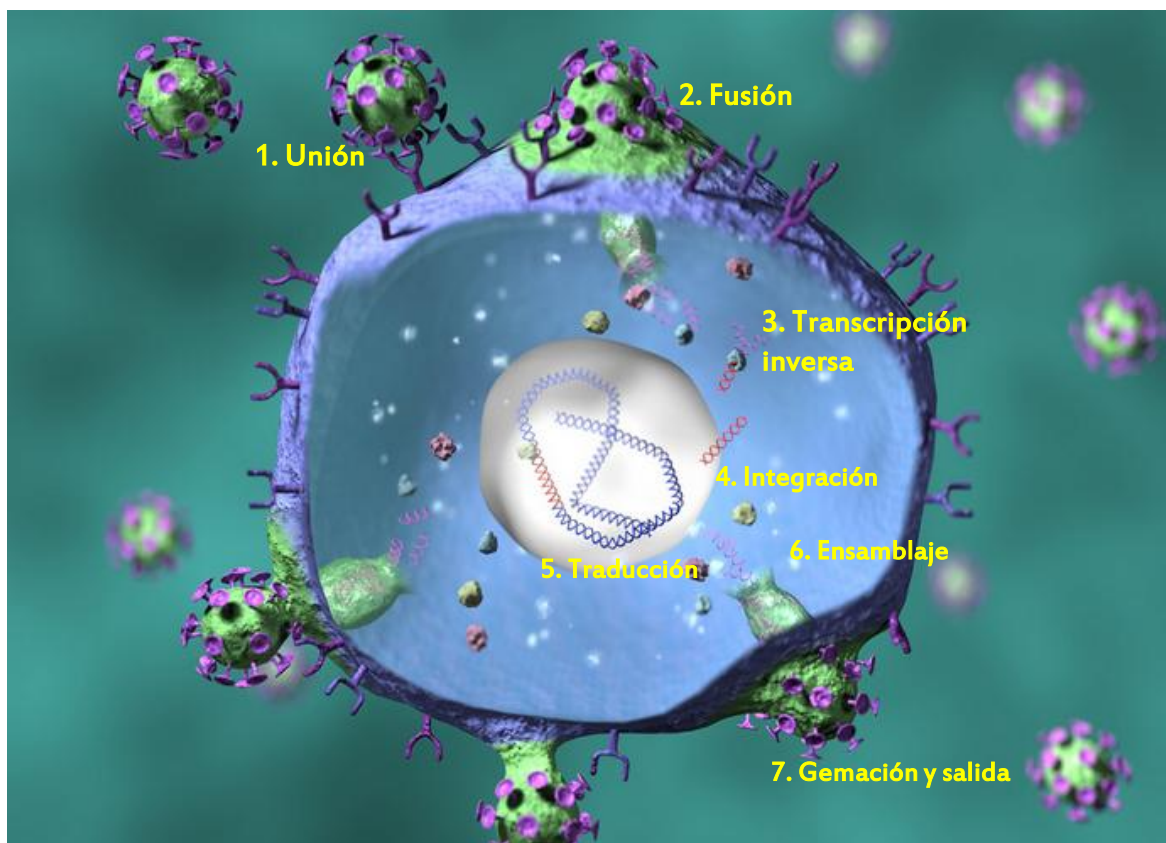
### **1.1.2 Ciclo de infección del VIH**

Las células diana del VIH son los linfocitos T CD4+, aunque también en mayor o menor medida los monocitos/macrófagos, las células dendríticas, las células de Langerhans y las células de microglía del cerebro. El virus se encuentra presente en numerosos fluidos del organismo, entre ellos la sangre y las secreciones vaginales. El ciclo de infección comienza con la entrada viral, que requiere la interacción entre la proteína viral gp120 y el receptor celular CD4, permitiendo que se inicie el proceso de fusión entre la membrana viral y la celular, en el que participa la proteína gp41 que interacciona con los correceptores CXCR4 o CCR5,<sup>22</sup> permitiendo la internalización de la nucleocápsida y la desencapsidación del genoma viral (**Figura 2**).<sup>21,23</sup>



**Figura 1. Estructura y organización genómica del VIH.** A | Estructura del virión de VIH, representación de las proteínas más relevantes. B | Genoma del VIH-1 de 9,2 Kb que contiene genes que codifican las proteínas enzimáticas y estructurales (*gag*, *pol* y *env*) halladas en todos los retrovirus competentes a la replicación, además de otros genes que codifican funciones virales únicas de esta familia de virus.

El descubrimiento de los dos correceptores ha ayudado a una mejor comprensión de la interacción de la envuelta viral con las células hospedadoras, así como el desarrollo de terapias para inhibir la entrada viral. Dependiendo del correceptor que el virus use para llevar a cabo la infección se denomina aislado viral X4-trópico o R5-trópico (correceptor CXCR4 ó CCR5, respectivamente) o dual-trópico (uso se ambos correceptores).<sup>22-24</sup> Tras la entrada del virus en la célula, se produce la retrotranscripción de una de las hebras de ARN a ADN bicatenario. Este proceso lo lleva a cabo la enzima transcriptasa inversa o retrotranscriptasa (RT), que es transportada en el propio virión.



**Figura 2. Ciclo del VIH y sus dianas terapéuticas.** 1-2 | La entrada viral requiere la unión de gp120 al receptor celular CD4 y a un correceptor (CCR5 ó CXCR4). La unión al correceptor origina cambios en la gp120 y el péptido transmembrana gp41, dando lugar a la fusión de las membranas. Los inhibidores de CCR5 como es el caso del maraviroc (Celsentri®) previenen la unión viral a este correceptor. Los inhibidores de fusión como enfurvitida (Fuzeon®) se unen a la gp41 y previenen los cambios conformacionales necesarios para la fusión viral con la célula. 3 | Dentro del compartimento citoplasmático, el núcleo viral internalizado y la enzima viral retrotranscriptasa copia el ARN viral en una hebra de ADN, la cual es transportada al interior del núcleo. Inhibidores de la retrotranscriptasa análogos y no análogos de nucleósidos (ITIN e ITINN) como tenofovir (Viread®), abacavir (Ziagen®) o efavirenz (Sustiva®) inhiben este proceso. 4 | Dentro del núcleo, la integrasa viral incorpora el ADN viral en el genoma celular, una etapa bloqueada por inhibidores de la integrasa como raltegravir (Isentress®). 5 | El ADN proviral integrado es transcrito para generar un ARN viral completo y múltiples secuencias de ARNm que son traducidos a proteínas (ej. precursores de Gag y Gag-Pol) por la maquinaria celular. 6 | Las proteínas virales y el ARN viral son transportados cerca de la membrana plasmática donde son ensamblados con factores celulares en el interior de la partícula viral. 7 | La gemación y salida de las partículas virales ocurre simultáneamente con la rotura de los precursores de Gag y Gag-Pol por la proteasa viral, dando lugar a un virión maduro. Inhibidores de la proteasa como atazanavir (Reyataz®) o darunavir (Prezista®) bloquean la etapa de rotura y previenen la formación de viriones maduros.

El ADN proviral es transportado al núcleo celular en un proceso en el que participan las proteínas virales p17 y Vpr,<sup>25</sup> además de otros factores celulares que forman la maquinaria de importación al núcleo. Posteriormente el ADN proviral es integrado en el genoma por

medio de la integrasa viral, aunque también se ha demostrado la presencia de ADN proviral libre que es susceptible de integración si se produce activación celular.<sup>26</sup>

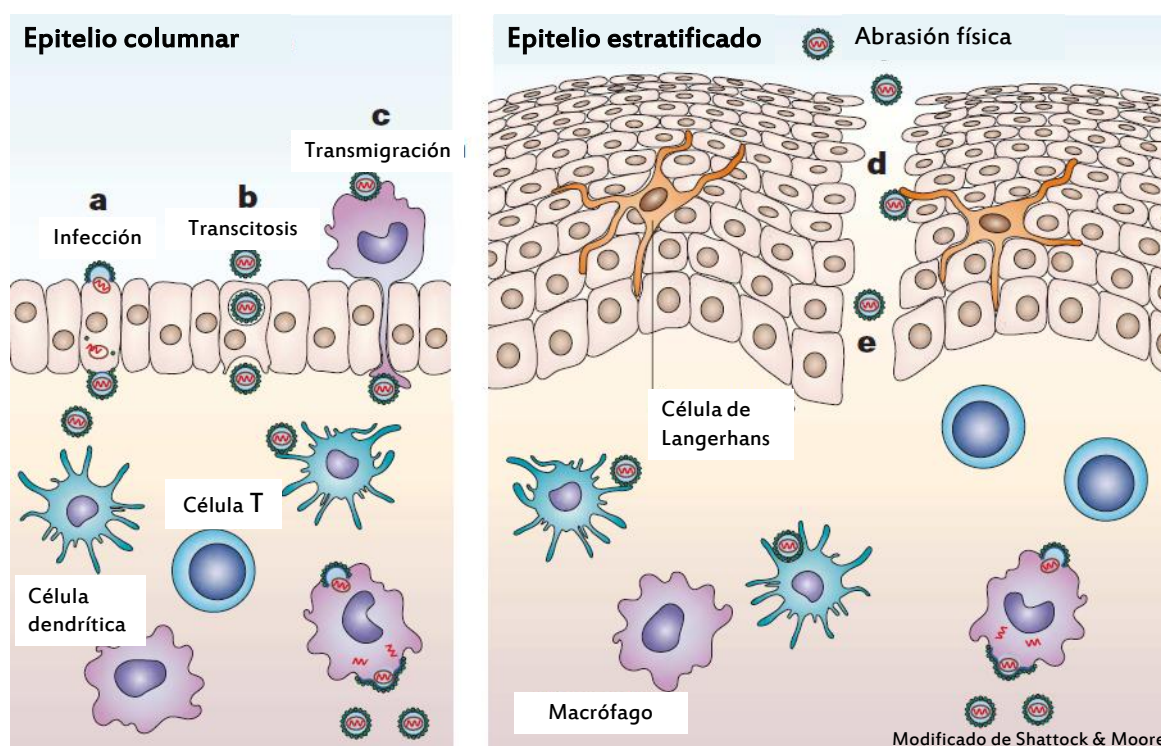
El ADN proviral integrado puede seguir un comportamiento variable: permanecer latente, replicarse de forma controlada o experimentar una replicación masiva. La replicación viral es un proceso sometido a una regulación compleja y depende tanto de factores virales como celulares.<sup>27</sup> El VIH utiliza el procesamiento alternativo de su transcrito de ARN completo para generar los diferentes ARNm que se requieren para la expresión de sus proteínas. Una vez procesadas, las proteínas virales son modificadas después de la transducción y antes del ensamblaje en lo que constituiría las partículas virales maduras.<sup>28</sup> La proteasa viral corta el precursor proteico p55 dando lugar a las proteínas de la nucleocápsida p24, p17, p9 y p6. El ciclo infectivo termina con la salida de nuevos viriones por gemación.<sup>20</sup> La gemación y salida de las partículas virales ocurre simultáneamente con la ruptura de los precursores de Gag y Gag-Pol por la proteasa viral, dando lugar a un virión maduro.

### **1.1.3 Invasión del VIH en el tracto genital femenino**

Una de las principales vías de transmisión del VIH es la sexual, que está mediada por exposición a células infectadas del líquido seminal o de las secreciones de la mucosa<sup>29</sup>. Aún no se conoce bien la transmisibilidad del virus libre de células en comparación con células que portan el virus.<sup>30</sup> Los riesgos de transmitir o contraer la infección son muy variados. Los estudios epidemiológicos indican que la transmisión está ligada a la cantidad de virus infeccioso que está presente en los fluidos genitales.<sup>31-32</sup> El TARGA disminuye la cantidad de VIH-1 en sangre a valores indetectables por los métodos habituales utilizados en clínica y en algunos casos se correlaciona con la no detección de virus en líquido seminal y en el tracto genital femenino, pero hay casos donde no hay detección en sangre y sí en líquido seminal y en el tracto genital.<sup>33-34</sup> Por eso, aunque algunos individuos infectados presentan un bajo riesgo de transmisión, otros pueden ser “súper-propagadores” y altamente infecciosos durante todo (o intermitentemente) el curso de la infección.<sup>35-36</sup> En la fase aguda de la infección, los individuos presentan un gran riesgo de transmisión del VIH, razón por la cual las epidemias usualmente se propagan de forma más virulenta cuando afectan a una nueva población; individuos VIH+ con cantidades elevadas de virus, debido a que desconocen su condición de recién infectados tienen un alto riesgo de transmisión del VIH a individuos no

infectados, que a su vez se convertirán en individuos VIH+ altamente virémicos sin dejar de ser sexualmente activos, iniciándose el ciclo una y otra vez.<sup>29</sup>

Entre el 30-40% de las nuevas infecciones por el VIH en mujeres, se producen a través del epitelio vaginal, con menor probabilidad de exposición por vía anal o parenteral. Durante el acto sexual, la transmisión del VIH de hombre a mujer es más eficiente que de mujer a hombre, con lo que las mujeres son más susceptibles a la infección por el VIH.<sup>37</sup> Tanto el epitelio vaginal como el cervical, van a ser el primer sitio donde las células seminales del hombre y las del tracto reproductor femenino se encuentren. Aunque parezca raro, en este sentido, la mayoría de los estudios se han llevado a cabo sobre viriones libres.<sup>38</sup> Se han propuesto distintos mecanismos para la transmisión sexual del virus, sin embargo, de ser alguno o algunos de los mecanismos implicados, la transmisión del VIH-1 es aún incierta (Figura 3).<sup>30</sup>



**Figura 3. Mecanismo de transmisión del VIH-1 a través de la mucosa del epitelio.** a | Infección directa de las células epiteliales. b | Transcitosis a través de las células epiteliales. c | Transmigración epitelial de células donantes infectadas. d | Captura del virus por las células de Langerhans. e | Paso a través de la ruptura de la barrera epitelial. Una vez transferido el virus a través de la barrera epitelial se produce una captura del VIH-1 por parte de las células dendríticas migratorias (por DC-SIGN u otra manosa tipo C-lectina) y la posterior difusión a los ganglios linfáticos de drenaje y/o la infección localizada por VIH-1 de la mucosa, lo que lleva al reclutamiento de otras células susceptibles de ser infectadas.<sup>29</sup>

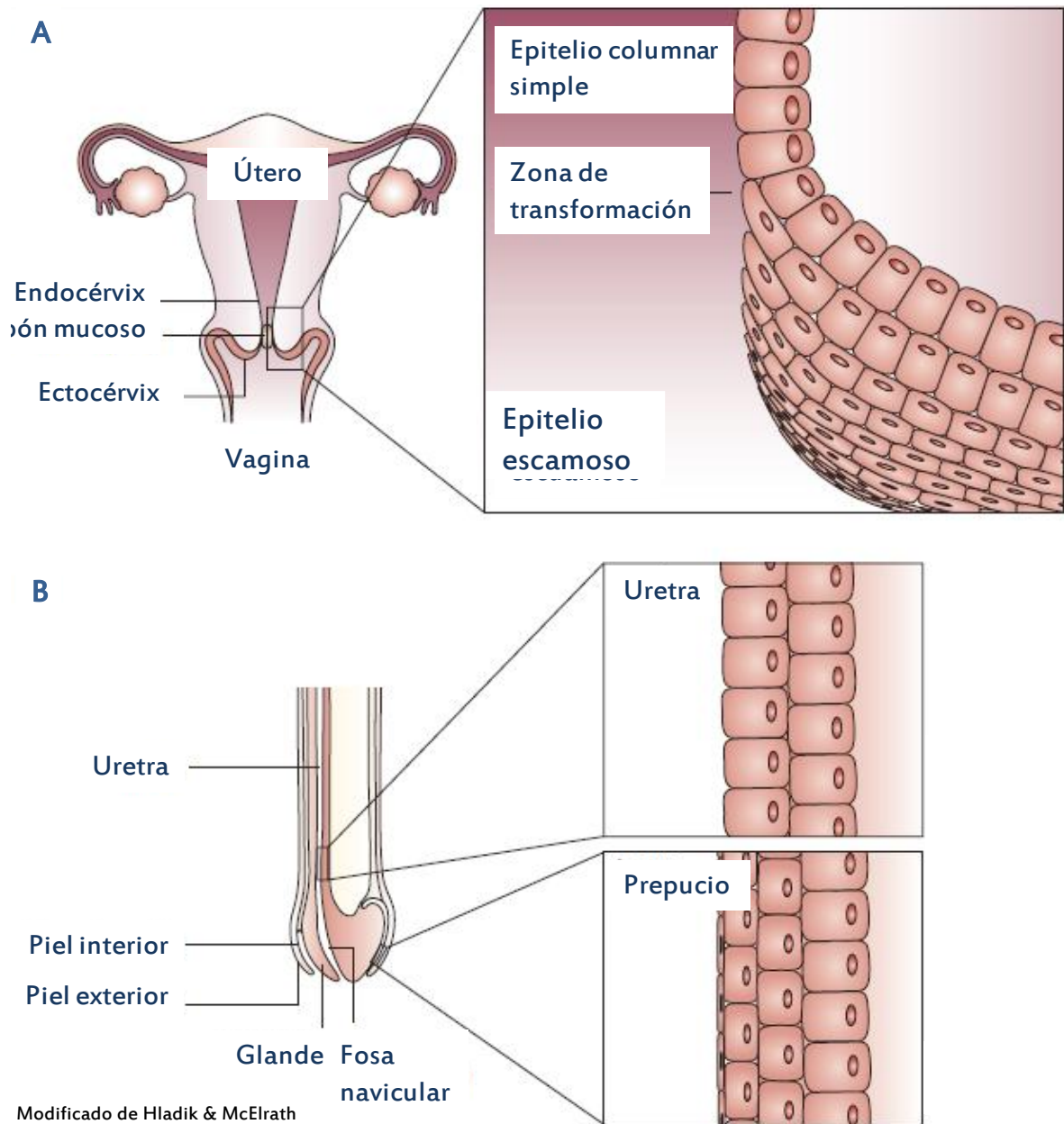
Cuando el epitelio escamoso estratificado que recubre la vagina y la ectocérvix se encuentra intacto, debido a su composición en múltiples capas tanto en la mucosa genital masculina como femenina, ofrece una mayor protección frente a la infección por el VIH que la que ofrece el epitelio simple columnar.<sup>39</sup> El epitelio en estas regiones tiene limitada la permeabilidad a las partículas que tienen un diámetro mayor de 30 nm.<sup>40</sup> Sin embargo, la mayor área de superficie de la pared vaginal y ectocérvix, que a menudo supera 15 veces la del endocérvix, proporciona un acceso más potencial para la entrada del VIH, particularmente cuando las rupturas se producen en la capa de células epiteliales.<sup>39</sup>

En principio, el tejido uterino es susceptible de infección si es inoculado directamente con VIH.<sup>41</sup> En mujeres que han nacido sin útero<sup>42</sup> y en hembras de macaco a las que se les ha extirpado quirúrgicamente el útero<sup>43</sup> se ha demostrado que tanto partículas de VIH como del SIV, respectivamente pueden atravesar la mucosa vaginal. De hecho, puede darse transmisión selectiva del VIH a través de la vagina en lugar de la mucosa del cuello del útero, ya que se ha observado que el uso del diafragma no producía ninguna disminución significativa en la transmisión del VIH.<sup>44</sup> La región en la que la ectocérvix se transforma en endocérvix tiene una población abundante de células T CD4+, siendo ésta una de las principales causas de su susceptibilidad a la infección por el VIH (**Figura 4**).

Aunque en humanos se desconoce si el VIH puede atravesar el tapón mucoso, llegar a la cavidad uterina e infectar a través de la mucosa del tracto genital superior,<sup>39</sup> se podría esperar el paso del virus a través del tapón mucoso ya que en monos se ha conseguido la infección uterina mediante un virus híbrido SIV-HIV (SHIV).<sup>45</sup> Posiblemente la mucosa del tracto superior sea más vulnerable a la infección por el VIH durante la ovulación, ya que durante este periodo los niveles de estrógenos alteran el mucus endocervical dándole una consistencia menos viscosa y más alcalina.<sup>39</sup> Además, en macacos tratados con progesterona se observa un descenso de la efectividad de esta barrera frente a la infección por el SIV.<sup>46-47</sup>

Viriones libres tanto de VIH como de SIV y viriones de leucocitos seminales (asociados a células) pueden producir infección en la mucosa.<sup>39</sup> Esto se ha observado *in vivo* en macacos<sup>48</sup> y ratones,<sup>49</sup> y en humanos a través de comparaciones de secuencias de aislados virales de mujeres infectadas y de células seminales y plasma de sus parejas también infectados.<sup>50</sup> También se ha confirmado la transmisión del VIH-1 libre de células y asociado a células mediante estudios *ex vivo*, utilizando explantes cervicales humanos.<sup>51-52</sup> En principio, el mucus cervical puede atrapar virus libre y células seminales infectadas.<sup>53-54</sup>





**Figura 4. Invasión del VIH.** **A** | En las mujeres, la invasión viral se produce principalmente a través del epitelio escamoso no queratinizado de la vagina y ectocérnix, así como a través del epitelio simple columnar del endocérnix. El canal endocervical está lleno de moco, proporcionando una barrera contra la entrada de agentes patógenos. Sin embargo, la ovulación conlleva la hidratación y alcalinización del tapón mucoso, posiblemente disminuyendo su función de barrera. La infección en las mujeres también puede producirse cuando el VIH-1 invade la monocapa del epitelio columnar del recto tras el coito anal. **B** | En los hombres, la invasión viral se presenta con mayor frecuencia a través del prepucio del pene y de la uretra, como consecuencia de la penetración vaginal o anal. El glándula del pene y el prepucio exterior están protegidos por epitelio escamoso queratinizado, lo que proporciona una fuerte barrera mecánica contra la invasión del VIH. Por el contrario, un pobre y delgado epitelio escamoso queratinizado cubre el interior del prepucio, lo que hace este sitio vulnerable a la invasión del VIH. Los hombres también pueden infectarse por el virus a través del recto.<sup>39</sup>

Varios estudios muestran que el VIH-1 se une y entra en las células epiteliales desde el tracto genital femenino inferior.<sup>55-57</sup> Se ha observado transcitosis tanto en células primarias como en líneas celulares, pero no en tejido intacto. Tras la liberación del virus, éste infecta sin dificultad a los leucocitos.<sup>58</sup> Se ha observado que los viriones asociados a células en comparación con los viriones libres, presentan mayor eficiencia en la transcitosis.<sup>59-60</sup> Se puede producir una infección productiva dentro de las propias células epiteliales cervicales,<sup>61</sup> aunque éste, es un tema controvertido,<sup>55,62</sup> pero sí se ha estudiado la infección productiva por SIV.<sup>63</sup> Es posible que el VIH-1 también pueda ser transportado a través del epitelio cérvico-vaginal a los vasos linfáticos de drenaje tanto por linfocitos como por macrófagos donantes, como se ha sugerido en estudios con ratones.<sup>39</sup>

Independientemente de la forma utilizada, el paso del virus a través del epitelio cérvico-vaginal *in vivo* se produce rápidamente, tras 30-60 minutos de exposición, como se muestra en macacos infectados por el SIV,<sup>64</sup> y en pocas horas a través de la mucosa epitelial en humanos.<sup>37</sup> Una vez en el epitelio, el VIH se encontrará con células T CD4+, y células de Langerhans. Las células de Langerhans tienen dendritas que se extienden y se retraen a través del espacio intercelular,<sup>65</sup> e incluso pueden llegar hasta la superficie del epitelio donde el VIH se puede unir directamente a estas células.<sup>66</sup> Aún así, no se ha demostrado, que el VIH utilice las células de Langerhans y las células dendríticas para saltarse la barrera de células epiteliales.<sup>39</sup>

Las células T CD4+ están dispersas en toda la lámina propia de la vagina humana (ectocérnix y endocérnix), a menudo bajo la membrana basal. También residen en un número variable dentro del epitelio escamoso vaginal y ectocervical.<sup>67-68</sup> La mayoría son células T de memoria que presentan una mayor expresión del correceptor CCR5 que las células T que circulan en sangre periférica.<sup>68-71</sup> Se ha confirmado la presencia de células T CD4+ infectadas en el estroma de la mucosa un día después de la inoculación del VIH-1 en cultivos de tejidos vaginales, ectocervicales y endocervicales.<sup>51,53,62,72</sup> Este resultado fue sorprendente, dada la presencia de células T CD4+ y CCR5+ en el epitelio escamoso. Sin embargo, al analizar el destino de los viriones marcados con fluorescencia dos horas después de la exposición al virus, se observó que el VIH-1 R5-trópico se unía muy eficientemente a las células T CD4+ intraepiteliales, seguido de fusión e infección productiva.<sup>69</sup> Por lo tanto, las células T infectadas deben salir rápidamente del epitelio, y las que se encuentran en el estroma pueden ser de la misma progenie de las células T intraepiteliales.



### 1.1.4 Invasión del VIH en el tracto genital masculino

De los casi 15 millones de hombres VIH+, se estima que un 70-75% se infectaron por VIH-1 a través del coito vaginal, por lo que el tracto genital masculino es el segundo sitio principal para la invasión del VIH después de la mucosa cérvico-vaginal. Las células diana del VIH-1 son abundantes en el prepucio, e incluyen células de Langerhans CD1a+ y linfocitos T CD4+ en el revestimiento escamoso, así como células T, macrófagos y células dendríticas en el estroma subyacente.<sup>73-76</sup> Fracciones variables de estas células expresan CD4, CCR5 y CXCR4.<sup>74-75</sup> Como en la vagina, las células de Langerhans no expresan DC-SIGN, mientras que al menos algunas células dendríticas del estroma sí lo expresan.<sup>74</sup> Por lo tanto, los mecanismos descritos para la infección del tracto genital femenino, son similares en el caso del tracto genital masculino.

Debido al efecto protector que presenta la circuncisión, ésta demuestra que el prepucio es particularmente vulnerable a la infección por el VIH.<sup>77-79</sup> El prepucio está formado por un epitelio escamoso estratificado y presenta una mayor queratinización en la parte externa que en la interna, debido a esto, la parte interna del prepucio es más susceptible a la infección por VIH (**Figura 4**).<sup>74-75</sup> A pesar del efecto protector que presenta la circuncisión frente a la infección por VIH, existen otras vías de entrada en sujetos a los que se les ha aplicado la circuncisión. El glándulo del pene tiene un epitelio escamoso queratinizado similar a la parte externa del prepucio, por lo que es improbable que por esta vía se produzca la infección. Por el contrario, la uretra del pene es mejor candidato para la infección, ya que está compuesta por un fino epitelio columnar estratificado no queratinizado, además de contar con un elevado número de células T CD4+ y CD8+, así como macrófagos, dentro del epitelio y la lámina propia. Un dato interesante es la ausencia de células dendríticas en la mucosa de la uretra.<sup>80</sup> La presencia de ARNm de CXCR4 y CCR5 en muestras de uretra indica la presencia de ambos correceptores,<sup>81</sup> de hecho, se ha llevado a cabo la infección en macacos con SIV a través de la uretra.<sup>82</sup> La presencia de VIH en el eyaculado de hombres VIH+ vasectomizados,<sup>83</sup> así como en el fluido preeyaculatorio,<sup>84</sup> sugiere la existencia de otra fuente de virus, situando a la uretra como un lugar donde albergaría un número importante de células susceptibles de ser infectadas por el VIH. Estos datos sugieren que las células T CD4+ y los macrófagos de la uretra masculina son una puerta para el VIH, aunque los pasos específicos que sigue el virus en la infección de la uretra aún se desconocen.<sup>39</sup>

Además de los epitelios vaginal y cervical, el epitelio del recto representa la vía predominante de transmisión del VIH durante las relaciones sexuales. A nivel mundial, los hombres que tienen sexo con hombres son el grupo de población con mayor riesgo de contraer el VIH, incluidos los países en desarrollo. En 2009, los hombres que tenían sexo con hombres representaban cerca del 60% de todas las nuevas infecciones por el VIH en los Estados Unidos y el 40% en Canadá. Sin embargo, existe poca información sobre las prácticas sexuales anales de las personas heterosexuales y su papel en la propagación del VIH en el África subsahariana.<sup>37</sup> La relativa facilidad mediante la cual se transmite el VIH por vía rectal<sup>85-86</sup> hace de ésta una importante, aunque relativamente descuidada ruta para orientar las estrategias de prevención.<sup>87-88</sup> La mucosa gastrointestinal es un órgano linfoide secundario que contiene la mayor parte de la población de linfocitos T CD4+ del organismo,<sup>37</sup> y por tanto, probablemente representa el mayor reservorio de VIH y el mayor lugar para la replicación viral en comparación con otras partes del cuerpo. Estos tejidos se encuentran densamente poblados con células dendríticas, macrófagos y células T que expresan CD4, CCR5 y, en menor medida, CXCR4.<sup>29,63</sup> A diferencia de la vagina, el canal rectal tiene sólo una única capa de epitelio columnar rico en células linfoides activadas.<sup>89</sup> Por lo tanto, cualquier interrupción en la integridad epitelial permite el acceso directo del VIH a una fuente rica de células diana, lo que permite el establecimiento de la infección en los sitios de la mucosa.<sup>63</sup> Después de la infección inicial, la replicación viral va seguida por la diseminación del virus a los ganglios linfáticos cercanos, momento en el que se establece la infección sistémica. Los estudios en modelos animales sugieren que la infección inicial puede ocurrir tras una hora de exposición y la difusión puede ocurrir dentro de las primeras 24 horas.<sup>90</sup>

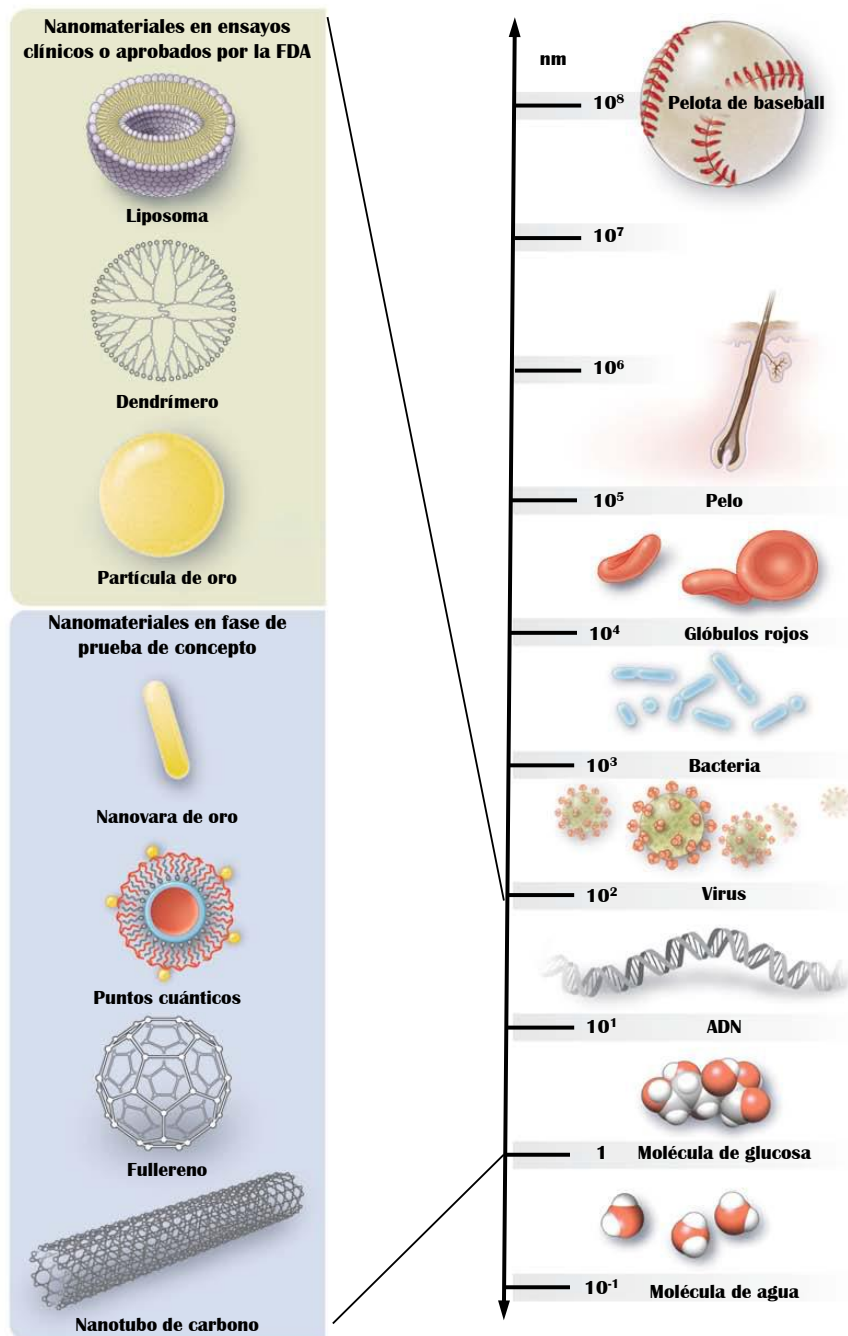
## **1.2 Nanomedicina y VIH**

La nanotecnología es una disciplina de la ciencia y la tecnología que está avanzando en muchas áreas de la medicina. Se trata de la comprensión, diseño, ingeniería y fabricación de materiales a nivel atómico y molecular (1 a 10 nm).<sup>10,91</sup> Debido al tamaño de los nanomateriales, estos pueden emplearse en el desarrollo de moléculas biológicas y sistemas con aplicaciones en la medicina, por ello, la aplicación de la nanotecnología en la medicina se conoce con el nombre de nanomedicina. Consiste por tanto en el desarrollo de materiales a escala nanoscópica que tengan una finalidad preventiva, terapéutica o de diagnóstico.<sup>92</sup> Ha sido en las últimas décadas cuando se han dado importantes avances en el

campo de la nanomedicina, particularmente en el diagnóstico y tratamiento del cáncer.<sup>93-97</sup> De la misma manera, las aplicaciones de la nanotecnología para la prevención y tratamiento del VIH/sida han ido ganando terreno.<sup>10,98-99</sup> Existen enfoques novedosos en los que la nanotecnología puede mejorar el tratamiento actual, así como avanzar en nuevas estrategias terapéuticas, como la terapia génica y la inmunoterapia. Por otra parte, algunos nanomateriales tienen efectos terapéuticos por sí mismos.<sup>100-102</sup> La nanotecnología también puede jugar un papel importante en las estrategias de prevención para el desarrollo de vacunas y microbicidas.<sup>99,102-105</sup> De tal forma que el desarrollo de nanomateriales biocompatibles se ha convertido en un objetivo importante en las compañías dedicadas a la biotecnología (Figura 5).

El uso de la nanotecnología para crear plataformas a través de las cuales se consiga la liberación de medicamentos está revolucionando la medicina en el tratamiento del VIH/sida.<sup>106</sup> Las plataformas basadas en la nanotecnología para la administración sistémica de fármacos antirretrovirales podría tener ventajas similares a las que ya se han observado en estudios para el tratamiento del cáncer.<sup>97,107-108</sup> Controlando los sistemas de liberación se puede reducir la toxicidad asociada al fármaco, proteger éste del metabolismo celular y dirigirlo eficientemente hasta las células, tejidos o compartimentos específicos, así como mejorar la vida media de los fármacos, manteniéndolos en la circulación en concentraciones terapéuticas por períodos más largos de tiempo.<sup>10,109-111</sup> Esto podría tener implicaciones muy importantes en la mejora de la adherencia a los medicamentos y disminuir o evitar el desarrollo de resistencias.

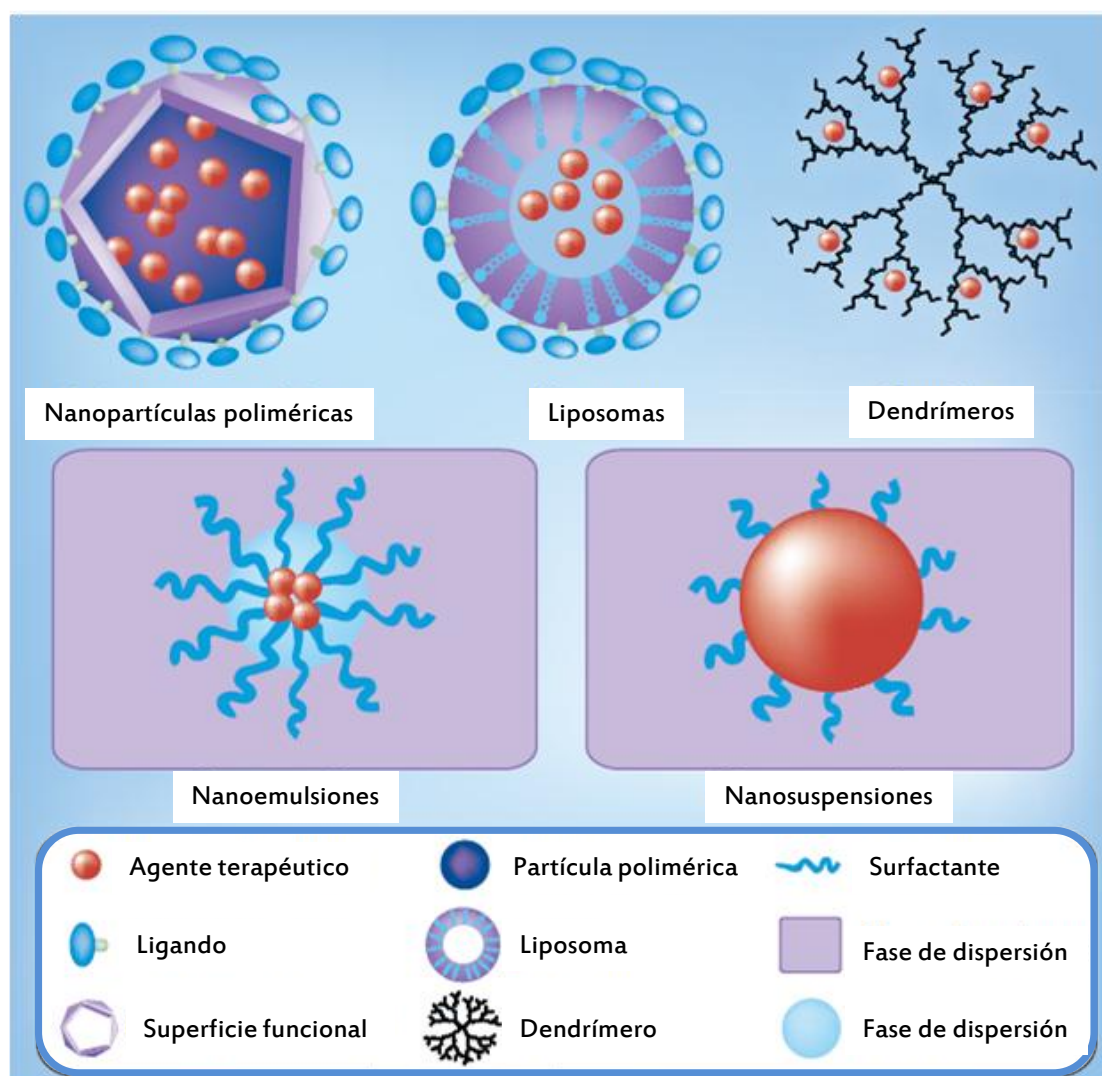
Los sistemas de liberación de fármacos a escala nanométrica, debido a su pequeño tamaño también ayudan a mejorar y modular la distribución de medicamentos hidrofóbicos e hidrofílicos hacia, y dentro de los diferentes tejidos. Esta particular característica de los sistemas de liberación nanométricos los hace más prometedores para su uso en el tratamiento clínico y la prevención del VIH.<sup>10</sup> En concreto, la liberación selectiva de fármacos antirretrovirales en las células T CD4+ y los macrófagos, así como en el cerebro y otros órganos, podría asegurar que los medicamentos lleguen a los reservorios latentes.<sup>112-113</sup> Por otra parte, mediante el control de la liberación de estos sistemas, los fármacos podrían ser liberados durante más tiempo y en concentración más efectiva a los objetivos específicos. El uso de la nanotecnología para la liberación de fármacos antirretrovirales se ha descrito en varios trabajos.<sup>98,114-115</sup>



Modificado de Betty et al.

**Figura 5. Nanomateriales utilizados en medicina.** Diversos nanomateriales están siendo utilizados en ensayos clínicos, o han sido aprobados por la Agencia de Fármacos y Alimentos de EEUU (FDA) para su uso en humanos; otros se encuentran en fase de prueba de concepto en los laboratorios de investigación. Liposomas que contienen moléculas anfifílicas, que contienen grupos hidrofílicos e hidrofóbicos que se acoplan en disolución. Nanopolímeros esféricos llamados dendrímeros que contienen grupos funcionales en la periferia. Nanopartículas de oro normalmente recubiertas por fármacos, oligonucleótidos o proteínas. Puntos cuánticos, estructuras semiconductoras de gran aplicación en contraste de imágenes. Fullerenos, macromoléculas de carbono individuales, con estructuras cerradas formadas por varias decenas de átomos de carbono únicamente. Nanotubos de carbono, formados únicamente por uniones carbono-carbono.<sup>116</sup>

Se exponen varios ejemplos del uso de estos sistemas en la **Figura 6**. Ya en 1996 Phillips y Tsoukas publicaron la encapsulación de AZT en un vehículo liposomal, evitando así la toxicidad hematopoyética en ratones y aumentando la actividad del fármaco frente al virus de la leucemia murina LP-BM5.<sup>117</sup> Se han desarrollado diferentes vehículos de transporte para reducir la toxicidad y mejorar la biodisponibilidad de los fármacos.<sup>118</sup> Un ejemplo de la liberación controlada de un fármaco por el pH se obtuvo por formación de un complejo lipídico con indinavir y tenofovir.<sup>119</sup> En terapia génica, el desarrollo de vectores no virales como los polímeros catiónicos o dendrímeros está en continua evolución, ya que determinados polímeros pueden condensar el ADN o el ARN de forma efectiva para así utilizarse como sistemas de transporte de ADN o ARN.<sup>120-125</sup>



Modificado de Mamo et al.

**Figura 6.** Representación esquemática de las distintas plataformas que pueden utilizarse para la prevención y tratamiento del VIH/SIDA<sup>10</sup>

Por lo tanto se están investigando nuevas aproximaciones basadas en la nanotecnología para el tratamiento o la prevención del VIH/sida. Estos son algunos ejemplos de las diferentes aproximaciones: terapia antirretroviral (indinavir, ritonavir, saquinavir...),<sup>126-128</sup> nanomateriales (fullereno, dendrímeros, nanopartículas de plata...),<sup>129-134</sup> terapia génica mediante el uso de ARNi (proteínas de fusión a péptidos, dendrímeros, nanotubos de carbono, proteínas de fusión anticuerpo-protamina, conjugados anticuerpo-péptido...),<sup>135-138</sup> (proteína p24<sup>gag</sup>, plásmidos de ADN...).<sup>139-140</sup>

### 1.2.1 Dendrímeros y VIH

Los dendrímeros son nanoestructuras ramificadas con una serie de características estructurales y topológicas únicas.<sup>98</sup> El término dendrímero procede del término griego *dendron*, que significa árbol o rama, y *mero*, que significa segmento.<sup>141</sup> Son moléculas de pequeño tamaño (normalmente inferior a 100 nm), con una estrecha distribución del peso molecular, y relativa facilidad de incorporación de ligandos, que hace de ellos candidatos atractivos para la administración de fármacos. Los dendrímeros tienen mínima polidispersidad y alta funcionalidad. Se obtienen uniendo varias unidades monoméricas, pero a diferencia de los polímeros convencionales, tienen una arquitectura tridimensional muy ramificada. Los dendrímeros se caracterizan estructuralmente por la presencia de un núcleo polifuncional, una serie de capas interiores, y una superficie multivalente (**Figura 7**).<sup>142</sup>

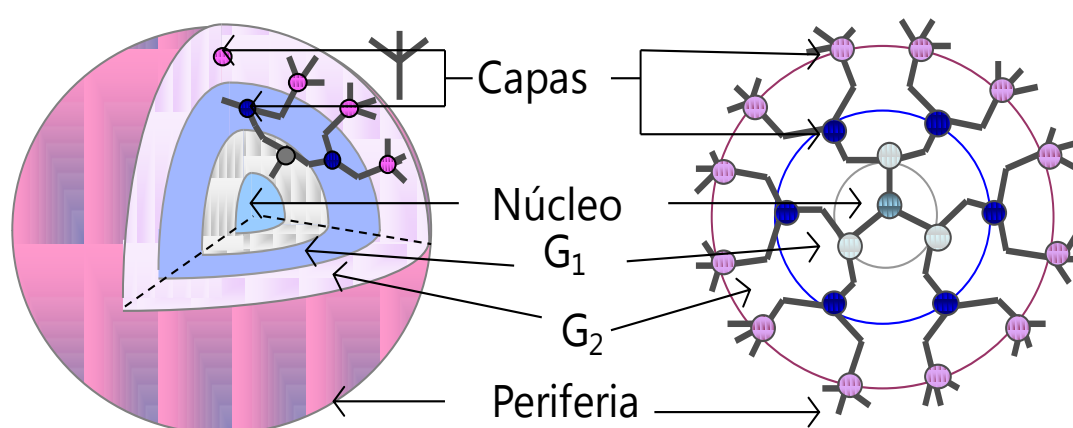


Figura 7. Representación esquemática de un dendrímero de segunda generación.

El núcleo polifuncional, rodeado de numerosas ramificaciones, tiene la capacidad de encapsular diferentes productos químicos. El núcleo aparece a su vez rodeado por varias

capas de unidades repetitivas altamente ramificadas, tales como poliéteres, porfirinas, poliamidoaminas y polifenilos y poliaminoácidos. Las propiedades del dendrímero vienen dadas por la superficie multivalente, que va a presentar distintos grupos funcionales que van a interactuar con el ambiente externo. Las propiedades fisicoquímicas de los dendrímeros pueden ser controladas durante la síntesis mediante el control de los grupos básicos, el grado de ramificación, y la naturaleza y/o número de grupos funcionales en la superficie.<sup>143</sup>

La actividad antiviral de los dendrímeros se ha mostrado *in vitro* frente al virus de la gripe,<sup>144</sup> virus respiratorio sincitial<sup>145</sup> y el VIH.<sup>146</sup> Estos dendrímeros principalmente actúan bloqueando la unión del virus a las células diana y por lo tanto actúan como inhibidores de la entrada en las etapas tempranas de la infección vírica, aunque también se han estudiado los mecanismos de acción secundarios en las etapas posteriores del ciclo de vida viral.<sup>142,147</sup> El mecanismo de inhibición depende de las características químicas de la superficie, así como del tamaño del dendrímero. Los dendrímeros con benceno dicarboxilato en la superficie inhiben la entrada del VIH en la célula por la unión a la cápside, por el contrario, los dendrímeros con naftaleno disulfonato entran en las células e inhiben la transcriptasa inversa y la actividad de la integrasa. Estos mecanismos de captación no han sido completamente aclarados y están siendo estudiados.<sup>148</sup>

Los dendrímeros solubles en agua se pueden utilizar como vehículos eficaces de agentes antirretrovirales que pueden ser atrapados en la estructura del dendrímero. Los antirretrovirales o sus profármacos también pueden ser atrapados covalentemente en la superficie de los dendrímeros, ya sea solos o en combinación con otras moléculas. Por lo tanto, los sistemas dendriméricos multivalentes son muy interesantes en el campo de la terapia antiviral.<sup>98</sup> Por ejemplo, se han utilizado dendrímeros para transfectar ARNi para reducir la infección del VIH *in vitro*. Dendrímeros carbosilano amino terminales se han utilizado para proteger y transferir ARNi a los linfocitos *in vitro*.<sup>122,137-138</sup>

### 1.2.2 Microbicidas frente al VIH

Como ya se ha mencionado anteriormente, debido a que las mujeres quedan excluidas de la toma de decisiones relacionadas con la sexualidad, o no reciben una educación sexual en profundidad, o bien tienen un acceso desigual a los métodos de prevención respecto a los hombres, las mujeres no comparten de la misma manera la responsabilidad de reducir los riesgos de la transmisión del VIH. Es por ello, por lo que en las últimas décadas entre

otras intervenciones terapéuticas preventivas se encuentran los microbicidas vaginales y/o rectales, que son capaces de reducir o eliminar el riesgo de la transmisión sexual del VIH-1. Los microbicidas, que supondrán un importante control del enfoque preventivo por parte de la mujer, también se basan en la disponibilidad de agentes que actúan como inhibidores eficaces de la infección por el VIH-1.<sup>149</sup>

El descubrimiento y desarrollo de compuestos antivirales para su uso como microbicidas, presenta una serie de problemas debido a que estos agentes deben ser no tóxicos, seguros para el uso repetido, y altamente eficaces contra el VIH-1, y deseable que también fueran eficaces frente a una amplia variedad de otros patógenos de transmisión sexual. De la misma manera, deben de ser fáciles de usar, carecer de olor y color, baratos de fabricar y se debe minimizar el daño en las mucosas.

#### **1.2.2.1 Inhibidores de la transcriptasa inversa**

Los inhibidores de la transcriptasa inversa se unen a la transcriptasa inversa del VIH-1 y bloquean la conversión del ARN viral en ADN, deteniendo de esta manera la replicación viral. El tenofovir fue el primer fármaco antirretroviral que se mostró en modelos animales como prueba de concepto contra la transmisión sexual del VIH, tanto en la profilaxis anterior como posterior a la exposición al virus.<sup>150</sup> Tomando como base diferentes estudios en animales el tenofovir se convirtió en el primer fármaco antirretroviral en ser evaluado como un microbicida vaginal en un ensayo clínico. En el ensayo de fase I HPTN 050 se usó un gel vaginal con tenofovir al 0,3 y 1% una o dos veces al día durante 14 días en mujeres infectadas y no infectadas por el VIH. El gel fue encontrado seguro y bien tolerado por los participantes en el ensayo clínico.<sup>151</sup> Los resultados preliminares de un ensayo de seguridad en fase II en un grupo mayor (HPTN 059) del gel vaginal de tenofovir, llevado a cabo en la India y los EE.UU. entre 200 mujeres VIH negativas sexualmente activas, encontró que el gel era seguro cuando se aplicaba diariamente o antes de cada acto sexual sobre un periodo de 6 meses.<sup>152</sup> Posteriormente se llevó a cabo un ensayo de fase IIb que evaluó la seguridad y eficacia del gel de tenofovir usado antes y después del sexo vaginal. El estudio, que involucró a 889 mujeres de Sudáfrica, mostró que el gel de tenofovir reducía el riesgo de contraer VIH en un 39% en comparación con un placebo.<sup>153</sup>

El ensayo clínico CAPRISA 004 proporcionó la primera prueba de concepto de que un microbicida podía ayudar a prevenir el VIH, un hallazgo que fue considerado un hito



importante en el campo de los microbicidas. Posteriormente, se puso en marcha el ensayo clínico CAPRISA 008 que pondrá a prueba la viabilidad y efectividad en la administración del gel de tenofovir en las clínicas de planificación familiar.

Existe un inhibidor de la transcriptasa inversa no análogo de nucleósidos (ITINN), el TMC120 (dapivirina) con el que se ha procedido a pruebas preclínicas y clínicas como posible microbicida de uso tópico. El TMC120 ha sido el primer ITINN que ha mostrado tener un efecto *in vivo* como microbicida tópico. Mediante el uso de un modelo de ratón inmunodeficiente,<sup>154</sup> se mostró que una formulación más viscosa del gel de TMC120 proporcionaba un 70-80% de protección respecto a una formulación menos viscosa, que protegía al 100% de los ratones, inoculados con virus R5 ó X4. Esto podría deberse a que la formulación más viscosa del gel pudo no haberse distribuido de forma homogénea en la mucosa vaginal. El TMC120 se está probando en varios ensayos clínicos, entre ellos el ASPIRE, un ensayo de fase III, para ver la eficacia de un anillo vaginal que contiene dapivirina. Es el primer ensayo de fase III de un anillo vaginal para prevenir el VIH. El estudio, llevado a cabo por la Microbicide Trial Network (MTN) tiene intención de realizarse en varios lugares de África, a mediados/finales del 2012. Se han inscrito alrededor de 3.476 mujeres que serán asignadas de forma aleatorizada al brazo para insertar el anillo de dapivirina o al brazo para insertar el anillo de placebo, cada cuatro semanas al menos durante un año.

Dentro de este grupo de microbicidas de uso tópico para la prevención de la transmisión del VIH, se incluyen los inhibidores del correceptor CCR5. CCR5 es el correceptor más importante para las cepas virales cuya diana son los macrófagos, que suelen predominar en las primeras etapas de la infección viral.<sup>155</sup> Un antagonista del receptor CCR5 es el CMPD167, un compuesto basado en ciclopentano, formulado como gel vaginal de 5 mmol que proporciona protección en un 80% frente al SHIV en un modelo de macacos.<sup>156</sup> El CMPD167 ha sido evaluado en combinación con dos péptidos que bloquean la interacción virus-célula, el BMS-378806 y el L-C52. El BMS-378806 se une la gp120 viral y previene la adhesión a los receptores CD4 y CCR5,<sup>157-158</sup> mientras que L-C52 (una versión modificada de enfuvirtida) inhibe la unión virus-célula mediada por la gp41 viral.<sup>156</sup> El uso de dos de estos agentes en combinación en un modelo de macacos protegió a 16 de los 20 macacos de la infección por SHIV, y el uso de los tres inhibidores juntos protegió a todos los animales estudiados. No hubo evidencia de irritación genital o inflamación por el uso de estos tres compuestos.<sup>156</sup>

Un reto importante para considerar el uso de los inhibidores de CCR5 como microbicidas tópicos es su incapacidad para bloquear la entrada de virus con tropismo X4. Aunque esta última vía es menos importante en la transmisión sexual, no por ello deja de ser importante su estudio. Otro factor a tener en cuenta es la estrategia evasiva que el virus puede realizar al verse incapaz de infectar a las células vía correceptor CCR5, por lo que lo correcto sería la búsqueda de un microbicida que actuara sobre ambos correceptores celulares.

Entre los candidatos a microbicidas en desarrollo clínico están maraviroc (MVC), una molécula pequeña que se une al correceptor CCR5 e impide la entrada del VIH-1 en las células. La prueba de concepto en el estudio de un modelo animal de macacos muestra que el MVC podría tener un potencial claro para proteger a las mujeres de la infección VIH-1 si se desarrolla como microbicida vaginal, ya que en un ensayo llevado a cabo con 7 macacos, sólo uno se infectó.<sup>159</sup>

### 1.2.2.2 Surfactantes

Los surfactantes fueron los primeros compuestos que se analizaron clínicamente para su utilización como microbicidas tópicos. Estos agentes rompen de manera no específica las membranas, ofreciendo propiedades anticonceptivas, así como un amplio rango de actividad frente a patógenos causantes de enfermedades de transmisión sexual (ETS).<sup>152</sup> El primer microbicida vaginal estudiado fue el Nonoxinol-9 (N9),<sup>160-161</sup> un agente surfactante aniónico desarrollado en 1960 como un espermicida con propiedades lubricantes, y posteriormente utilizado para recubrir los preservativos de látex. El N9 destruye la integridad de la bicapa lipídica, y por lo tanto tiene una acción virucida mediante el daño en la envuelta del virus.<sup>162</sup> La actividad antiviral del N9 se mostró *in vitro* en 1985<sup>163</sup> y en 1995 *in vivo* en macacos y se observó una disminución de la transmisión del SIV.<sup>164</sup> De tal forma que el N-9 pasó a ensayos clínicos.

En un estudio llevado a cabo en Camerún en mujeres VIH negativas trabajadoras del sexo, no se encontraron diferencia en la tasa de infección por el VIH, aunque sí se observó una mayor incidencia de las úlceras vaginales, que se asoció con el uso del N-9.<sup>160</sup> En el ensayo de seguridad de fase I en voluntarias sanas en Londres, se mostró que la administración regular del N-9 producía evidencias histológicas de inflamación vaginal, incluyendo el aumento de células T CD4+ y macrófagos.<sup>165</sup> El ensayo clínico multicéntrico

en fase III controlado y randomizado del N-9 (COL 1492) llevado a cabo en el año 2002, mostró que el N-9 no tenía eficacia en la prevención de la transmisión del VIH.<sup>161</sup> Además, la tasa de transmisión fue algo superior en el grupo de mujeres tratadas con N-9. Se concluyó que el incremento en el número de mujeres infectadas por el tratamiento con N-9 podría estar relacionado con la toxicidad e irritación local vaginal observada en estudios anteriores.<sup>165</sup>

Posteriormente, la compañía Byosin, desarrolló un nuevo surfactante, el C31G (Savvy), que mostró ser seguro *in vitro* y tener un amplio espectro de actividad frente a bacterias, el virus herpes simple-2 (VHS) y el VIH.<sup>166-169</sup> El C31G fue analizado en tres ensayos independientes en Ghana y Nigeria,<sup>170-172</sup> ensayos que fueron suspendidos ya que las tasas de infección en la población estudiada fueron mayores en el grupo tratado con el surfactante en comparación con el grupo placebo.<sup>173</sup>

El tercer tipo de surfactante estudiado fue el laurilsulfato de sodio,<sup>174</sup> que se formuló para actuar como un "preservativo invisible" que pudiera cubrir la pared vaginal como líquido a temperatura ambiente, y posteriormente se transformara en un gel a la temperatura corporal, pudiendo disminuir la transmisión del VIH-1 y las ETS. El estudio en fase II de seguridad fue positivo<sup>175</sup> y están planeadas nuevas fases de desarrollo clínico del "preservativo invisible" como un posible microbicida para prevenir la transmisión sexual del VIH.

### 1.2.2.3 Protectores de la flora vaginal

El segundo abordaje para el desarrollo de microbicidas está basado en mantener, restaurar y aumentar los mecanismos de protección natural del interior de la vagina, manteniendo un pH ácido (entre 4 y 5,8) para proteger de la infección por el VIH.<sup>176-178</sup> Sin embargo, una variedad de situaciones, incluyendo la presencia de semen o de la vaginosis bacteriana, neutraliza la acidez inicial de la vagina. Los compuestos microbicidas que se basan en este abordaje operan como agentes directos de acidificación o como potenciadores de la producción de lactobacilos.<sup>152</sup>

Carbopol 974P (BufferGel) es un agente amortiguador que mantiene la acidez normal de la vagina en presencia del eyaculado. Varios estudios mostraron que el VIH se inactiva a pH entre 4 y 5,8. Se observó su efecto espermicida,<sup>179</sup> y virucida en el VIH y el VHS.<sup>180</sup> En

ensayos de fase I se mostró que Carbopol 974P fue inocuo y bien tolerado.<sup>181-182</sup> En el ensayo realizado para analizar efectividad en mujeres, aunque se observó un 30% de disminución de la transmisión del VIH, los resultados no fueron estadísticamente significativos respecto al grupo placebo, y se concluyó que Carbopol 974P no tenía efecto protector frente al VIH.<sup>183</sup>

Una estrategia "probiótica" que se está desarrollando para proteger la flora biótica o vaginal, es el uso de los lactobacilos, ya que previamente se mostró una correlación entre la presencia de lactobacilos y la disminución de la replicación del VIH.<sup>184-185</sup> La colonización de vaginas de macacos se logró de forma segura con *Lactobacillus crispatus*, y una investigación piloto con nueve mujeres mostró una tasa de colonización del 60%.<sup>186-187</sup> Por tanto, parece interesante el desarrollo de "microbicidas vivos" que se unan al VIH evitando de esta manera la infección de las células. Un trabajo recientemente llevado a cabo en macacos mediante la infección con SHIV, ha mostrado una disminución del 63% de la transmisión del virus mediante el uso de *Lactobacillus jensenii* como microbicida.<sup>188</sup>

#### 1.2.2.4 Inhibidores de la entrada

Los inhibidores de la entrada viral forman una cuarta clase de agentes microbicidas. Forman parte de este abordaje las secuencias que bloquean la unión del VIH-1 a las células huésped, la fusión de las membranas del virus y la célula, o la entrada del VIH-1 en las células huésped.

El primer grupo de inhibidores de la entrada viral que fue investigado fueron los polímeros aniónicos.<sup>189</sup> A través de su carga negativa, los polímeros aniónicos pueden interactuar con las proteínas del VIH e interferir con la unión del VIH a las células T CD4+.<sup>190-191</sup> La proteína gp120 del VIH CXCR4 presenta mayor carga negativa, lo que hace a los virus con tropismo X4 particularmente vulnerables a estos compuestos. En contrapartida, esto no siempre es tan fiable en el caso de virus con tropismo R5. Por ejemplo, el dextran-sulfato reduce *in vitro* la infectividad de virus X4 (VIH-1 HSBc2) en un 77%, pero no en el caso de virus R5 (VIH-1 JRCsf).<sup>192</sup>

El naftaleno sulfonato (PRO2000) es un polímero sulfonado con actividad *in vitro* contra el *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, SIV, VIH-1 y VHS-2.<sup>193-194</sup> Los ensayos clínicos en fase I llevados a cabo en Europa,<sup>195</sup> EE.UU. y Sudáfrica<sup>196</sup> mostraron que

el PRO2000 tenía buena tolerancia. Sin embargo, cuando se utilizaron concentraciones altas (4%), estas se asociaron con un mayor sangrado menstrual en comparación con el grupo placebo.<sup>197</sup> La investigación clínica continuó con un ensayo clínico de seguridad y de eficacia en fase II/IIb en 3101 participantes (HPTN 035), y un ensayo clínico de eficacia en fase III (MPD-301). El ensayo clínico fase III HPTN 035 informó en febrero de 2009, que los resultados obtenidos para el PRO 2000 fueron del 30% de efectividad en comparación con el placebo, aunque no fue estadísticamente significativo, no pudiéndose demostrar que fuera efectivo para la prevención del VIH y parándose el estudio.<sup>183</sup>

El carragenano (Carraguard/R515) es un polímero sulfatado procedente de un alga. Además de bloquear la transmisión del VIH-1 mediante la unión a la envuelta del VIH-1, se observó que evitaba la migración de células mononucleares infectadas por el VIH a través de epitelio vaginal a los ganglios linfáticos pélvicos en modelos de ratón.<sup>198</sup> Tanto los ensayos de seguridad en fase I como los ensayos en fase II mostraron que Carraguard y formulaciones similares a éste eran seguros para su utilización en mujeres y hombres no VIH y en infectados por el VIH.<sup>199-203</sup> El ensayo clínico en fase III con Carraguard y placebo que se realizó en 6202 mujeres VIH-negativas en Sudáfrica, mostró que aunque Carraguard fue seguro durante un período de 2 años, la tasa de infecciones nuevas por el VIH fueron similares en el grupo tratado con Carraguard y en el placebo.<sup>204</sup>

El sulfato de celulosa es un compuesto que mostró actividad *in vitro* contra la *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Gardnerella vaginalis*, VIH-1 y VPH.<sup>205-209</sup> Este microbicida actúa uniéndose al loop V3 de la gp120 del VIH-1, e inhibe virus con tropismo X4 y R5.<sup>210</sup> El ensayo de seguridad en fase I que reclutó a 518 mujeres y 48 hombres mostró que el uso del gel de sulfato de celulosa era seguro.<sup>211-216</sup> En el año 2007 se iniciaron dos ensayos clínicos en fase III en África e India comparando el gel de celulosa sulfato con el placebo. El ensayo se detuvo debido a una mayor tasa de infección en el grupo tratado con el gel.<sup>217-219</sup>

Una nueva categoría de polímeros aniónicos son los dendrímeros. El primer dendrímero en ser formulado como un gel microbicida y aprobado para pasar a fase clínica III fue el SPL7013 (VivaGel®), siendo efectivo en un modelo de macacos infectados con SHIV y en otros dos modelos animales infectados con VHS-2,<sup>220-221</sup> así como *in vitro* frente a VHS-1 y VHS-2.<sup>220,222-223</sup> Se estudió la tolerancia masculina del SPL7013 en un ensayo de seguridad en fase I en Australia,<sup>224</sup> y otro ensayo en fase I en mujeres jóvenes sexualmente

activas mostró la tolerancia y seguridad del uso del SPL7013.<sup>225</sup> El SPL7013 es un dendrímero desarrollado por la compañía australiana Starpharma, cuyo componente activo es un dendrímero basado en lisina con 32 grupos ácido disulfónico naftaleno en su superficie.<sup>226</sup> Las cargas de su superficie le permiten unirse a la proteína gp120 del VIH.<sup>224</sup>

El SPL7013 muestra amplio espectro de actividad *in vitro* contra una amplia gama de cepas de VIH-1 y VIH-2, es activo contra el VIH-1 en cultivos de explantes, bloquea la infección por VIH-1 *in vitro* en presencia de suero y secreción cérvico-vaginal, y presenta actividad inhibitora frente al VIH-1 en el plasma seminal. SPL7013 no potencia la replicación del VIH-1 *in vitro* y muestra una baja toxicidad en líneas de células epiteliales del cuello uterino y colorrectal,<sup>227</sup> además de inhibir la replicación en estos tipos celulares con cepas CCR5.<sup>228</sup> El SPL7013 tiene una actividad inhibitora similar contra CXCR4 (virus X4) y CCR5 (virus R5) utilizando las cepas de VIH-1 en cultivos celulares mediante el bloqueo de la unión del virus y la entrada en la célula.<sup>223,229</sup>

Nombre	Clase	Estado	Ref.
Tenofovir	Inhibidor de la RT	CAPRISA 008	[148-151]
Dapivirina (TMC120)	Inhibidor de la RT	Fase III	[152]
CMPD167	Inhibidor de CCR5	Testado en macacos, no más publicaciones	[153-156]
Maraviroc	Inhibidor de CCR5	Testado en macacos, no más publicaciones	[157]
Nonoxynol-9 (N9)	Surfactante	Fracaso en ensayos clínicos	[158-163]
SAVVY	Surfactante	Fracaso en ensayos clínicos	[164-171]
Laurilsulfonato de sodio	Surfactante	Fase II, no más publicaciones	[172-173]
Carbopol 974P (BufferGel)	Protector de la flora vaginal	Fracaso en ensayos clínicos	[177-181]
Lactobacilos	Protector de la flora vaginal	Testado en macacos, no más publicaciones	[182-186]
PRO 2000	Polianión	Fracaso en ensayos clínicos	[191-195]
Carraguard	Polianión	Fracaso en ensayos clínicos	[196-202]
Sulfato de celulosa	Polianión	Fracaso en ensayos clínicos	[203-217]
SPL7013 (VivaGel®)	Polianión	Fase I, no más publicaciones	[218-228]

**Tabla 1. Estado de los microbicidas en el pasado y en la actualidad**

El algoritmo empleado con el SPL7013 está siendo el ejemplo a seguir para el desarrollo como fórmula de aplicación tópica vaginal para impedir la infección del virus durante el acto sexual. Este dendrímero es actualmente el primero y el único tratamiento basado en dendrímeros que está autorizado para proceder con los ensayos clínicos por la FDA y la fase I de ensayos en humanos ya ha sido realizada con éxito.<sup>225</sup> A raíz del ensayo en fase I se observó que el uso de VivaGel® durante 14 días producía un aumento de las citocinas genitales y subconjuntos de células T que se asociaron con los hallazgos clínicos de disfunción eréctil y con un mayor riesgo de infección por el VIH en las mujeres, aunque los

autores del trabajo explicaron que pudo deberse al aumento de ciertas citocinas durante el ciclo menstrual, por lo que la relación entre estas variaciones y su susceptibilidad frente al VIH no están del todo claro, y como los mismos autores explican, deben realizarse más ensayos, ya que en este solo se estudió el efecto sobre 54 mujeres sanas.<sup>230</sup>

Por tanto, el posible desarrollo de un microbicida para su uso como profilaxis y así evitar la transmisión del VIH, es un campo de trabajo que se encuentra actualmente en pleno desarrollo. Por ello, en esta Memoria se plantea el uso de dendrímeros carbosilano aniónicos como futuribles para su desarrollo y uso como microbicidas vaginales.





## ***2. OBJETIVOS***



## 2. OBJETIVOS



A pesar de la eficacia de la TARGA y los resultados considerables en reducir el precio de los medicamentos en entornos de escasos recursos, la imparable propagación del VIH continúa abrumando todos los esfuerzos que se hagan para contenerla. Es por ello, por lo que el desarrollo de microbicidas ha cobrado gran importancia, sobre todo en los países en vías de desarrollo donde son el único elemento disponible para poder luchar contra la infección.

El objetivo principal de esta Memoria es evaluar y comparar las propiedades anti-VIH de distintos dendrímeros carbosilano aniónicos, y su posible desarrollo como un microbicida de uso tópico para evitar la transmisión del VIH.

Los objetivos planteados en esta Memoria han sido los siguientes:

1. Evaluar si la combinación de los dendrímeros carbosilano aniónicos carboxilados (2G-C16) y sulfonado (2G-S16) presentan mayor actividad anti-VIH en comparación con el uso de ambos dendrímeros por si solos, en un modelo de epitelio vaginal y en células mononucleares de sangre periférica (CMSP).
2. Desarrollar nuevos dendrímeros uniendo complejos metálicos con el objetivo de potenciar la actividad anti-VIH.
3. Evaluar la actividad anti-VIH de los nuevos dendrímeros desarrollados para su posible aplicación en modelos animales de infección por VIH-1, y el posible desarrollo de un microbicida.



### ***3. MATERIAL Y MÉTODOS***



## 3. MATERIAL Y MÉTODOS



### 3.1 Células

**Células mononucleares de sangre periférica (CMSP):** la sangre se obtuvo de buffy coats procedentes del Centro de Transfusiones de la Comunidad de Madrid. La sangre se diluyó en igual volumen de PBS y se procedió a su centrifugación en gradiente de densidad (Ficoll-Hypaque®). Tras la centrifugación se recuperó el halo que contenía las CMSP y se procedió a dos ciclos de centrifugación-lavado con PBS estéril. Las CMSP resultantes se cultivaron en medio de cultivo RPMI 1640 (Biochrom KG Seromed) suplementado con 10% de suero de ternera fetal (STF) inactivado por calor, 1% de penicilina/estreptomicina, y 2 mM de L-glutamina (ICN Pharmaceuticals, CostaMesa, CA, USA) a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Las CMSP se activaron con fitohemaglutinina (PHA) (Remel) a una concentración de 1 µg/mL y se trataron con interleucina-2 (IL-2) (Bachem) a una concentración de 60 UI/mL durante 48 horas antes de la realización de experimentos.

**HEC-1A (ATCC HTB-112):** línea celular endometrial humana, derivada de un adenocarcinoma humano de endometrio. Se cultivaron en medio de cultivo McCoy's 5A suplementado con 10% de STF inactivado por calor, 1% de penicilina/estreptomicina, y 2 mM de L-glutamina a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

**VK2/E6E7 (ATCC CRL-2616):** línea celular de mucosa vaginal humana transducida con el vector viral LXSN-16E6E7. Se cultivaron en medio de cultivo Keratinocyte-SFM (Gibco®) con 0,1 ng/mL de factor de crecimiento epitelial (EGF), 0,05 mg/mL de pituitaria bovina (Sigma-Aldrich) y cloruro cálcico 0,4 mM a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

**U87.CD4.CXCR4 y U87.CD4.CCR5:** clones de la línea celular U-87MG. Se caracterizan porque presentan en su superficie el marcador CD4 y los correceptores CXCR4 y CCR5, respectivamente. Se obtuvieron a través del NIH AIDS Research and Reference Reagent Program. Se crecieron de forma rutinaria en medio de cultivo DMEN suplementado con 10% de STF inactivado por calor, 1% de penicilina/estreptomicina, 2 mM de L-glutamina, 1 µg/ml de puomicina (Sigma-Aldrich) y 300 µg/ml de Geneticina G418 (Invitrogen Life Technologies) a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

**HeLa:** línea celular epitelial humana, procedente de un adenocarcinoma de cérvix. Se obtuvieron a través del NIH AIDS Research and Reference Reagent Program. Se crecieron de forma rutinaria en medio de cultivo “Dulbecco’s Modified Eagle Medium” (DMEN) (Biochrom KG Seromed) suplementado con 5% de STF inactivado por calor, 1% de penicilina/estreptomicina, y 2 mM de L-glutamina a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

**TZM.bl:** línea celular procedente de una línea HeLa. Expresa CD4, CXCR4 y CCR5 además de la proteína Tat que expresa de manera inducible el gen de la luciferasa y genes reporteros de la  $\beta$ -galactosidasa. Se obtuvieron a través del NIH AIDS Research and Reference Reagent Program. Se crecieron de forma rutinaria en medio de cultivo DMEN suplementado con 5% de STF inactivado por calor, 1% de penicilina/estreptomicina, y 2 mM de L-glutamina a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

**MT-2:** línea celular de leucemia de células T con ADN de HTLV-1 integrado. Se obtuvieron a través del NIH AIDS Research and Reference Reagent Program. Se crecieron de forma rutinaria en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 10% de STF inactivado por calor, 1% de penicilina/estreptomicina, y 2 mM de L-glutamina a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

**HEK293T/7:** línea celular epitelial humana procedente de riñón. La línea celular 293T/17 es un derivado de la línea celular 293T (293tsA1609neo). 293T es un derivado altamente transfectable de la línea celular 293 en el que se insertó el gen sensible a la temperatura de antígeno T de SV40. Esta línea celular se utiliza para obtener una línea capaz de producir altos títulos de retrovirus infeccioso. Debido a estas características se utilizó la línea 293T para la producción del aislado viral AD8 (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program). Se crece de forma rutinaria en medio de cultivo DMEN suplementado con 5% de STF inactivado por calor, 1% de penicilina/estreptomicina, y 2 mM de L-glutamina a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

**GHOST:** Las células GHOST, constituyen una línea celular derivada del osteosarcoma humano (HOS) que expresa en su superficie celular CD4 y varios receptores de quimiocinas (CCR5, CCR3, CXCR4). Se obtuvieron a través del NIH AIDS Research and Reference Reagent Program. Se crecieron de forma rutinaria en medio de cultivo DMEN suplementado con 10% de STF inactivado por calor, 1% de penicilina/estreptomicina y 2 mM de L-glutamina a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.



## 3.2 Obtención de virus

Crecimiento de aislados del VIH-1. Los aislados virales de laboratorio **VIH-1<sub>NL4.3</sub>** (aislado viral X4), **VIH-1<sub>BaL</sub>** (aislado viral R5) y **VIH-1<sub>AD8</sub>** (aislado viral R5), se expandieron en la línea celular MT-2, en un cultivo primario de CMSP y en la línea celular 293T, respectivamente. Para la expansión del aislado X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub> se partió de un total de  $3 \times 10^6$  de células MT-2, que se centrifugaron y resuspendieron en un volumen de 100  $\mu$ L de medio RPMI completo. Posteriormente se añadió la cepa viral VIH-1<sub>NL4.3</sub> a una concentración infectiva de 200 ng de VIH/10<sup>6</sup> células y se mantuvieron las células a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> durante 3 horas agitando el cultivo cada 15-30 minutos. Transcurrido este tiempo, se recogieron y se lavaron varias veces para retirar el exceso de virus y posteriormente se cultivaron en un único pocillo de una placa de 6 pocillos con 3 mL de medio. Transcurridas 72 horas se recogieron y se pasaron a una botella o “flask” de 75 cm<sup>2</sup> al que se añadieron  $20 \times 10^6$  células MT-2, resuspendidas en 10 mL de medio. Cada 72-96 horas se recogió la mitad del sobrenadante y se añadieron células nuevas para continuar la expansión. El sobrenadante del cultivo se repartió en alícuotas y se almacenó a -80°C para posteriormente cuantificar la producción de antígeno p24<sup>gag</sup> por ELISA.

Para la expansión de la cepa viral R5 VIH-1<sub>BaL</sub> se utilizaron CMSP procedentes del banco de sangre de Madrid y de Albacete. Las CMSP se obtuvieron por centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque®. Posteriormente se lavaron con PBS y finalmente se mantuvieron durante 48 horas en medio RPMI completo con IL-2 y estimuladas con PHA a 1  $\mu$ g/mL. Para comenzar la expansión viral, se añadió la cepa viral VIH-1<sub>BaL</sub> a una concentración de 50  $\mu$ g de VIH/10<sup>6</sup> células sobre un total de  $50 \times 10^6$  de CMSP y se cultivaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 3 horas. Transcurrido este tiempo, se recogieron, se lavaron y se llevaron a un pocillo de una placa de 6 pocillos con 3 mL de medio RPMI completo. 72 horas después se recogió la mitad del sobrenadante de cultivo y se guardó una alícuota para la posterior cuantificación de antígeno p24<sup>gag</sup>, y a las células restantes se añadieron  $50 \times 10^6$  CMSP previamente tratadas con PHA para activarlas e IL-2 para mantener la viabilidad del cultivo. A los 7 días del comienzo de la expansión, se recogió el sobrenadante de cultivo, se dividió en alícuotas y se almacenó a -80°C. Posteriormente se cuantificó la producción de antígeno. Para la expansión del aislado R5 VIH-1<sub>AD8</sub> se partió de cultivo confluyente de células 293T. Se partió de 500  $\mu$ L de buffer HeBS (HEPES-buffered saline solution) y de 15  $\mu$ g de DNA, 50  $\mu$ L de CaCl<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O. Ambos se

incubaron por separado durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se mezclaron y se incubaron durante 30 minutos a 22-24°C. Tras esta incubación se añadió la mezcla a la placa de células 293T y se cultivaron durante 12 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se lavaron las células con PBS para eliminar los restos de plásmido que no hubiera entrado en las células, y se añadió medio de cultivo DMEN. A las 24 y 48 horas se recogió sobrenadante del cultivo para cuantificar la producción de antígeno p24<sup>gag</sup> por ELISA.

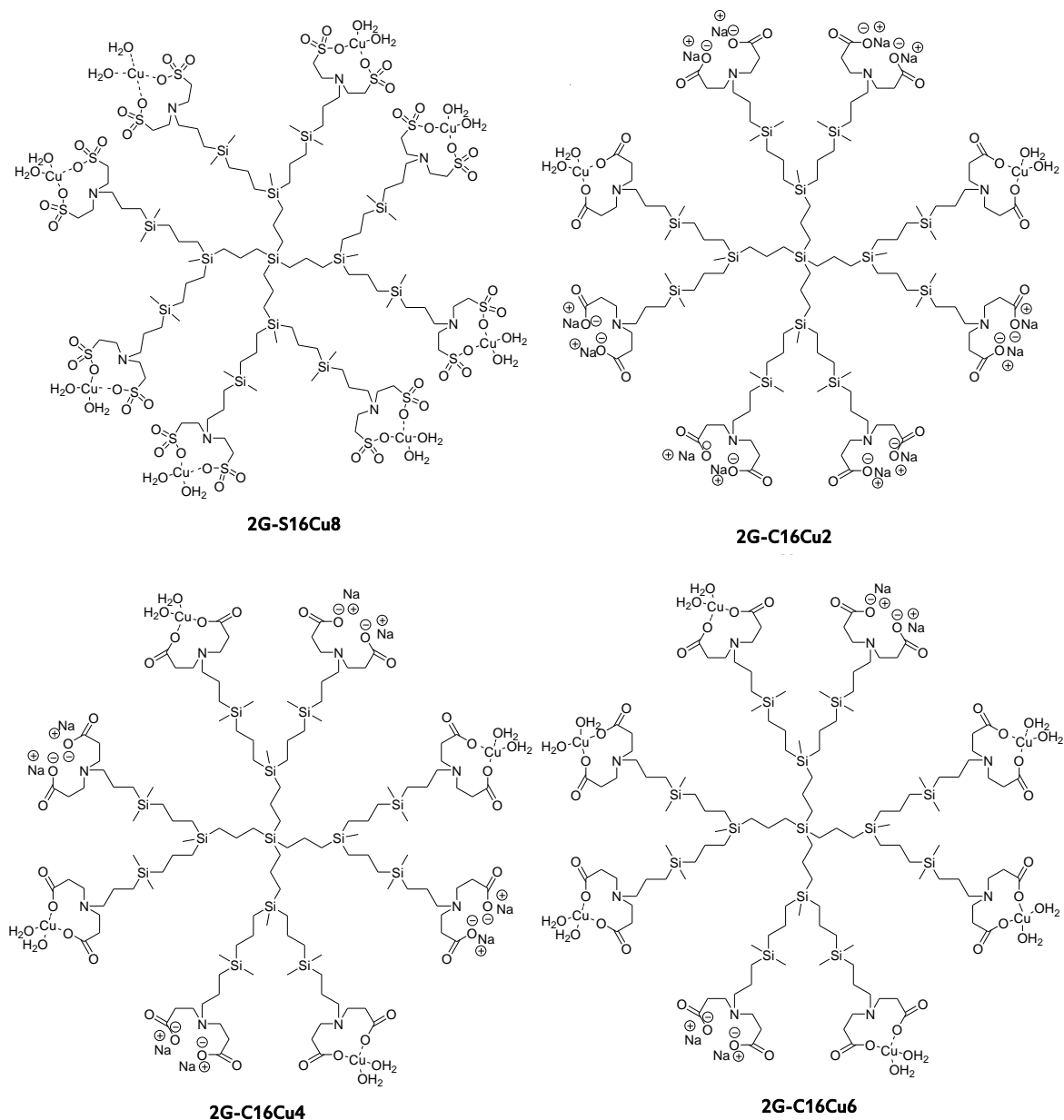
### 3.3 Aislado viral de individuos VIH+

Los aislados virales de individuos VIH+ fueron cedidos por la Dra. Perez, del ISCIII de Madrid. Con el fin de obtener aislados primarios del VIH-1, se obtuvieron CMSP separadas por centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque®, o muestras de plasma ultracentrifugadas se cocultivaron con CMSP de individuos seronegativos, estimuladas con PHA de acuerdo con el protocolo de VRL del Grupo de Ensayos Clínicos del SIDA (ACTG) (ACTG Virology Manual for HIV Laboratories 1993).<sup>231</sup> La expansión viral se siguió mediante la formación de sincitios. Los sobrenadantes fueron retirados dos veces por semana y el antígeno p24<sup>gag</sup> se midió una vez por semana durante 4 semanas. Al día 7, 14, 21 y 28 los sobrenadantes se dividieron en alícuotas y se almacenaron a -80°C. Las células a partir del día 28 de cocultivo fueron crioconservadas. Las cepas virales se expandieron en CMSP estimuladas con PHA. Las células se resuspendieron en medio de cultivo con IL-2 y se cultivaron a 37°C durante 14 días. Cada 3-4 días, se retiraron 100 µl para cuantificar el antígeno p24<sup>gag</sup>. Al día 4 y 11 la mitad del medio de cultivo fue reemplazado con medio nuevo con IL-2, y en el día 7 se retiró la mitad del sobrenadante y se añadieron 5x10<sup>6</sup> CMSP previamente estimuladas con PHA. A día 14 el sobrenadante se dividió en alícuotas en muestras de 1 mL y se almacenó a -80°C.

La caracterización biológica de las poblaciones virales se basó en el uso preferencial del correceptor mediante la infección de la línea celular humana de osteosarcoma GHOST, que expresa independientemente uno u otro correceptor CCR5 o CXCR4. Además, se determinó la formación o no de sincitios en la línea celular MT-2, y la TCID50/mL de cada virus se determinó por el método desarrollado por Japour et al.<sup>232</sup> Se obtuvieron los siguientes aislados virales: VIH-1<sub>ES X-3016-2</sub> (F1), VIH-1<sub>ES P-2392-3</sub> (CRF02\_AG) y VIH-1<sub>ES X-2457-2</sub> (BF), todos ellos virus R5-trópicos.<sup>233-235</sup>



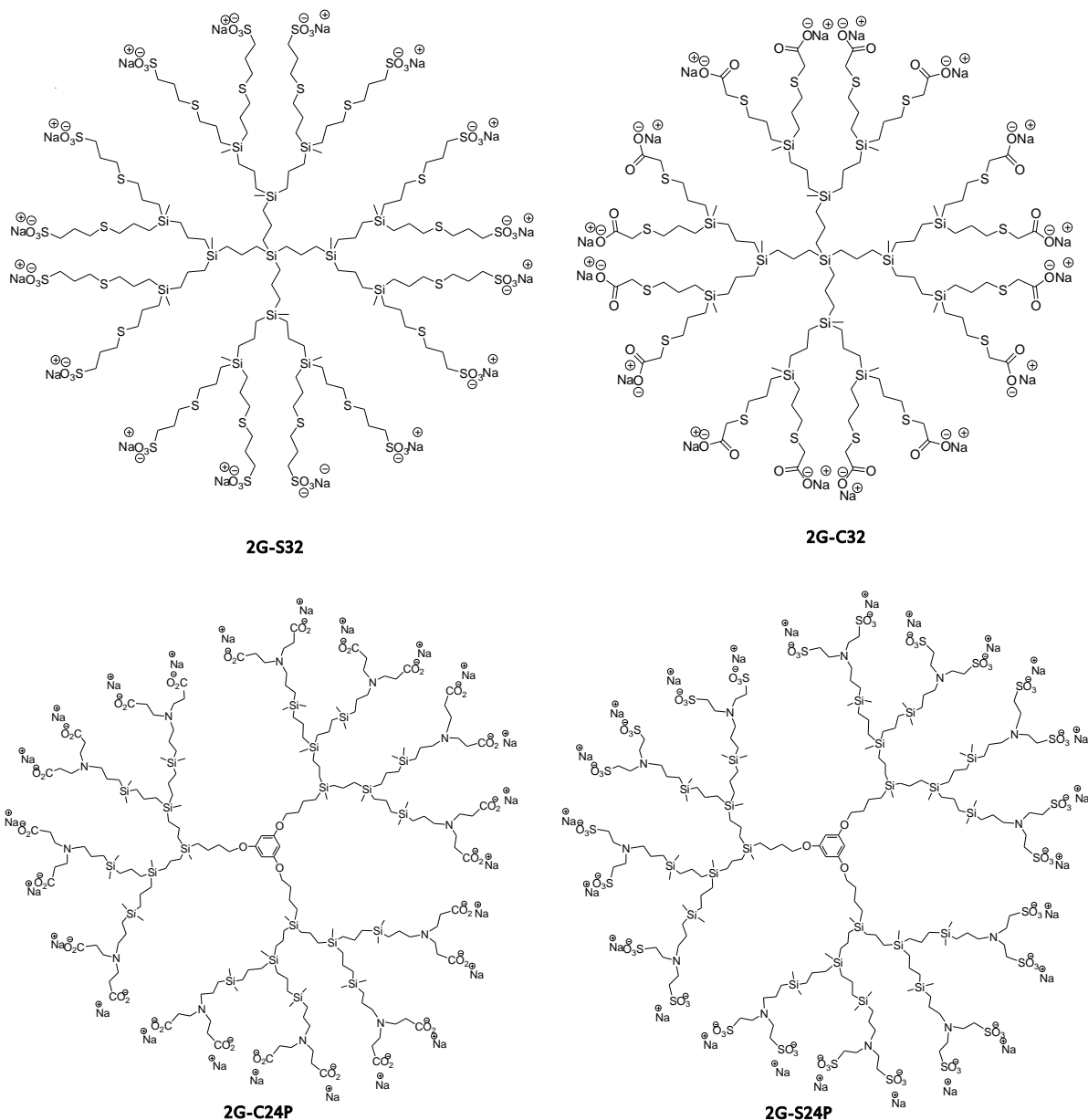
El 2G-S16Cu8, 2G-C16Cu2, 2G-C16Cu4 y 2G-C16Cu6 (métalo-dendrimeros de segunda generación con grupos sulfonato o carboxilato unidos a complejos metálicos de cobre) (Figura 9);



**Figura 9. Representación de los métalo-dendrimeros carbosilano aniónicos con grupos carboxilato y sulfonato.** 2G-S16Cu8 <> C<sub>112</sub>H<sub>276</sub>Cu<sub>8</sub>N<sub>8</sub>O<sub>64</sub>Si<sub>13</sub> (Pm: 4145,92 g/mol); 2G-C16Cu2 <> C<sub>128</sub>H<sub>252</sub>Cu<sub>2</sub>N<sub>8</sub>Na<sub>12</sub>O<sub>36</sub>Si<sub>13</sub> (Pm: 3247,48 g/mol); 2G-C16Cu4 <> C<sub>128</sub>H<sub>260</sub>Cu<sub>4</sub>N<sub>8</sub>Na<sub>12</sub>O<sub>40</sub>Si<sub>13</sub> (Pm: 3354,68 g/mol); 2G-C16Cu6 <> C<sub>128</sub>H<sub>268</sub>Cu<sub>6</sub>N<sub>8</sub>Na<sub>4</sub>O<sub>44</sub>Si<sub>13</sub> (Pm: 3461,87 g/mol).

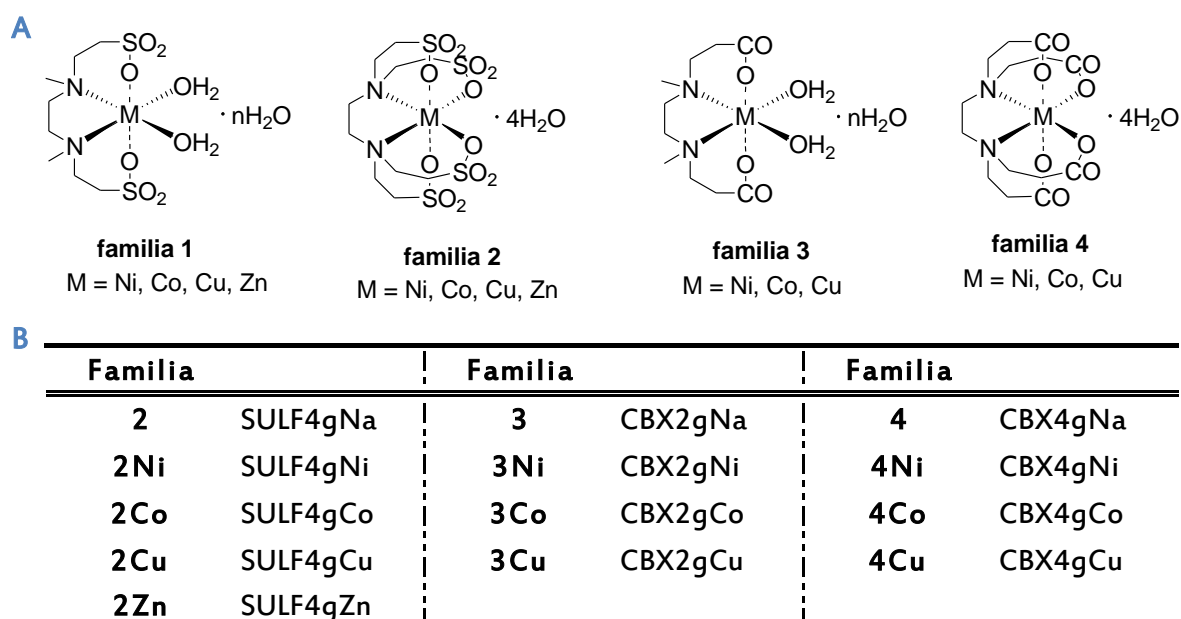
El 2G-S32, 2G-C32 (dendrimeros carbosilano aniónicos de segunda generación con grupos carboxilato y sulfonato respectivamente en la periferia, sintetizados mediante una

síntesis tiol-eno), 2G-C24P y 2G-S24P (dendrimeros carbosilano aniónicos de segunda generación con grupos carboxilato y sulfonato respectivamente en la periferia y núcleo polifenólico) (Figura 10). El silicio central se corresponde con la generación cero, excepto en el caso de los dendrimeros con núcleo polifenólico (2G-C24P y 2G-S24P), donde la generación cero corresponde al polifenol y los tres silicios adyacentes.



**Figura 10. Representación de los dendrimeros carbosilano aniónicos con grupos carboxilato y sulfonato en la periferia sintetizados con una reacción tiol-eno y con núcleo polifenólico respectivamente. 2G-S32 <> C<sub>144</sub>H<sub>300</sub>Na<sub>16</sub>O<sub>48</sub>S<sub>32</sub>Si<sub>32</sub> (Pm: 4558,92 g/mol); 2G-C32 <> C<sub>128</sub>H<sub>236</sub>Na<sub>16</sub>O<sub>32</sub>S<sub>16</sub>Si<sub>13</sub> (Pm: 3533,21 g/mol); 2G-C24P <> C<sub>213</sub>H<sub>402</sub>N<sub>12</sub>Na<sub>24</sub>O<sub>51</sub>Si<sub>21</sub> (Pm: 5084,18 g/mol); 2G-S24P <> C<sub>189</sub>H<sub>402</sub>N<sub>12</sub>Na<sub>24</sub>O<sub>75</sub>S<sub>24</sub>Si<sub>21</sub> (Pm: 5954,36 g/mol)**

Los siguientes silicios representan la generación 1, y así hasta la generación 2 que corresponde a los dendrímeros utilizados. Esto es independiente del número de grupos terminales que posea el dendrímero, ya que una segunda generación puede tener 16, 24 ó 32 grupos terminales. Los ligandos polianiónicos fueron sintetizados por el método desarrollado por Liang et al.<sup>236</sup> mediante una reacción tipo Michael.<sup>102</sup> En esta Memoria se hace referencia a 4 familias de ligandos (**Figura 11**). El procedimiento de síntesis de los diferentes dendrímeros y sus precursores se han inscrito en la Oficina Española de Patentes y Marcas.<sup>237-238</sup> (número de solicitud: P201231187; referencia: ES1957.7; país: España).



**Figura 11. Ligandos polianiónicos.** **A** | Representación molecular de los ligandos polianiónicos. **B** | Relación de las distintas familias de ligandos polianiónicos. La familia 2 está compuesta por los complejos metálicos unidos a 4 grupos sulfonados. La familia 3 y 4 están compuestas por los complejos metálicos unidos a 2 y a 4 grupos carboxilados respectivamente.

## 3.6 Reactivos

Como controles de inhibición de la replicación del VIH-1 se utilizaron: dos inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleótido, el **AZT** o zidovudina (Retrovir, GSK) y el **TDF** o tenofovir (Gilead Sciences); un inhibidor de la transcriptasa inversa no análogo de nucleótido, el **EFV** o efavirenz (Bristol-Myers Squibb); un inhibidor de la fusión del VIH-1 a las células dianas debido a su unión a la glicoproteína gp41 del VIH-1, el **T-20** o Fuzeón (Genetech USA, Inc. And Trimeris, Inc.); un polisacárido complejo y ramificado formado por

numerosas moléculas de glucosa utilizado como control de no producir toxicidad celular en determinados ensayos, el **Dextrano** (Sigma-Aldrich); un inhibidor de la unión electrostática a la glicoproteína de la envuelta gp120 de la región V3 del VIH-1, el **Suramin** (Sigma-Aldrich); un antagonista altamente específico al CXCR4 que bloquea las variantes virales T-trópicas y dual-trópicas (R5/X4) las cuales necesitan del CXCR4 para poder entrar a las células, el **AMD3100** o Biciclamo (Sigma-Aldrich)<sup>239</sup>; un compuesto no peptídico que interactúa con CCR5, es un derivado del amonio cuaternario llamado **TAK-779**<sup>240</sup>, un antagonista del correceptor CCR5 (también se puede utilizar en monoterapia), el **maraviroc** (MVC) o Celsentri® (Pfizer), .

## 3.7 Estudio de toxicidad

### 3.7.1 Ensayos de reducción de sales de tetrazolio

Ensayo **MTT** (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (Sigma-Aldrich). Este método permite determinar aquellos daños celulares que se traducen en una disminución de la actividad mitocondrial de la célula. El ensayo colorimétrico MTT se basa en la capacidad que tienen las células viables de reducir el 3-(4-5dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromuro a cristales púrpuras de formazán; pudiéndose medir de esta manera la citotoxicidad de determinadas sustancias o moléculas. Se llevó a cabo un ensayo MTT para analizar la toxicidad de los ligandos polianiónicos en CMSP. Se incubaron las CMSP durante 24 horas con los ligandos a concentraciones de 0,5, 2 y 5  $\mu\text{M}$ . Como control de viabilidad celular se utilizaron células no tratadas y células tratadas con Dextrano. Como control de muerte celular se utilizaron células tratadas con DMSO al 20%.

Ensayo **MTS** (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) (Promega). Este método colorimétrico permite ver en células en viabilidad la citotoxicidad, proliferación y quimiosensibilidad. En presencia de fenásin metosulfato (PMS), se producen cristales púrpuras de formazán; pudiéndose medir de esta manera la citotoxicidad de determinadas sustancias o moléculas.

Se estudió la viabilidad de los dendrímeros 2G-C16 y 2G-S16 en las líneas celulares U87.CD4.CXCR4 y U87.CD4.CCR5. Las líneas celulares se incubaron durante 24 y 48 horas con las concentraciones 1, 2, 5, 10, 15, 20, 50 y 100  $\mu\text{M}$  de los dendrímeros 2G-C16 y 2G-S16. Como control de viabilidad celular se utilizaron células sin tratar y células tratadas con

Dextrano (Sigma-Aldrich). Como control de muerte se utilizaron células tratadas con dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich) al 20%.

En el momento del ensayo, el medio de cultivo se reemplazó por 100 µL de medio de cultivo nuevo y sobre éste se añadió 20 µL de una mezcla de los compuestos MTS y PMS estériles. Tras 1 hora de incubación, a 37°C y una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>, se realizó la medición en un lector de placas Synergy™ 4 (Biotek) a una longitud de onda de 490 nm. La viabilidad relativa (%) se calculó respecto al control sin tratar.

### **3.7.2 Marcaje con 7AAD**

Por citometría de flujo se evaluó la presencia de células apoptóticas o necróticas en presencia de dendrímeros. Para la identificación de las células apoptóticas o necróticas se utilizó el anticuerpo 7AAD (Sigma). En todos los casos se incluyeron controles negativos y positivos de apoptosis, células sin tratar y tratadas con DMSO al 10%, respectivamente. Las células se seleccionaron respecto al tamaño (Forward Scatter) y complejidad (Side Scatter) de la población total, pudiéndose de este modo distinguir las células vivas de las muertas. Se compararon los porcentajes de 7AAD+ respecto a la población total y dentro de esta población la región identificada como viva por su tamaño y complejidad.

Para el ensayo de toxicidad de los dendrímeros 2G-S16Cu8, 2G-C16Cu2, 2G-C16Cu4 y 2G-C16Cu6 en CMSP se incubaron las células durante 24 y 48 horas con las concentraciones 1, 2, 5, 10, 15, 20 y 50 µM de los dendrímeros. Como control de viabilidad celular se utilizaron células no tratadas y células tratadas con Dextrano. Como control de muerte celular se trataron con DMSO al 20%. En estos experimentos se incluyeron los dendrímeros 2G-C16 y el 2G-S16 a concentración no tóxica de 10 µM, ya que en la periferia presentan los mismos grupos funcionales que los dendrímeros a estudiar. Tras la incubación de las células con los distintos compuestos durante 24 y 48 horas, se recogieron células y sobrenadante, se realizó el marcaje con 7AAD y se analizaron por citometría de flujo.

### **3.7.3 Ensayo de liberación de lactato deshidrogenasa**

Se utilizó el kit CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega) para evaluar el daño en la superficie de la membrana celular debido a la presencia de los dendrímeros carbosilano. La lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima que se libera en el



citoplasma debido a la lisis celular. El ensayo de liberación de LDH, por lo tanto, es una medida de integridad de la membrana, que se basa en la oxidación de LDH a piruvato y la reducción de sales de tatrazoilo de formazán por el piruvato.

Se dispensaron en placas de 96 pocillos de fondo redondo  $1 \times 10^5$  células/pocillo en un volumen de 100  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo y se añadió el dendrímero en un volumen de 100  $\mu\text{L}$  para obtener un volumen final de 200  $\mu\text{L}$ . Las células se incubaron durante 24 horas y se procesaron según las instrucciones del fabricante para la obtención de la citotoxicidad.

### 3.7.4 Ensayo de hemólisis

Los hematíes se obtuvieron después de ser separados de las CMSP mediante gradiente de densidad (Ficoll-Hypaque®). Se diluyeron en PBS estéril hasta poder ser visualizados de forma individualizada. Después se resuspendieron en un volumen de 500  $\mu\text{L}$  de PBS estéril y se cultivaron en placa de 24 pocillos ( $3 \times 10^5$  hematíes/pocillo). Como control positivo de lisis se utilizaron células tratadas con Tritón X-100 al 0,2%. Como control negativo se utilizaron las células tratadas con PBS. Los hematíes se incubaron con distintas concentraciones de dendrímero. Se evaluó la presencia de hemaglutinación, número de células y liberación de hemoglobina a la hora mediante la recogida de 100  $\mu\text{L}$  de sobrenadante y medición de la absorbancia por espectrofotometría a una longitud de onda de 550 nm y 690 nm en un lector de placas Synergy™ 4.

## 3.8 Evaluación de la toxicidad sobre la movilidad espermática

Se realizó un ensayo de supervivencia espermática. Este ensayo es uno de los métodos de control de calidad más utilizados en los laboratorios de reproducción asistida.<sup>241-242</sup> El ensayo de supervivencia espermática es accesible a la mayoría de los laboratorios de reproducción como método para la evaluación de toxicidad de los espermatozoides a diferentes elementos.<sup>242-244</sup> Las muestras de semen fueron capacitadas por *swim-up* para realizar el test de Recuperación de Espermatozoides Móviles (REM). Se añadieron alícuotas de cada una de estas muestras a tubos con 1 mL de Sperm Prep (Medicult, Denmark) fresco para alcanzar una concentración final de espermatozoides móviles progresivos de  $5 \times 10^6/\text{mL}$ . Se añadieron cantidades no tóxicas y previamente seleccionadas de cada

dendrímtero a su tubo problema. Se analizó la toxicidad provocada o no por cada dendrímtero y si ésta era dependiente de la concentración. El efecto se analizó frente al control, tubo con  $5 \times 10^6$  de espermatozoides móviles progresivos pero sin dendrímtero. Todos los tubos se prepararon por duplicado.

Se analizó la movilidad progresiva espermática (%) y el índice de movilidad progresiva espermática (IMPE) a las 24 horas. El índice de movilidad progresiva espermática evalúa el efecto sobre la supervivencia espermática imputable al efecto del dendrímtero. Un índice de movilidad progresiva espermática  $<0,75$  se evalúa como efecto tóxico para el espermatozoide por parte del dendrímtero analizado en la concentración estudiada. La movilidad espermática se evaluó con el sistema automatizado Sperm Class Analyzer® v5.0.

## **3.9 Experimentos**

### **3.9.1 Infección celular**

Este apartado se ha dividido en tres con el objetivo de conocer el efecto de los diferentes dendrímeros y ligandos antes de que se produjera la infección por el VIH-1 de las distintas líneas celulares (experimentos de pre-tratamiento), después de la infección de las mismas (post-tratamiento) y para analizar la internalización del VIH-1 en la célula.

#### **3.9.1.1 Experimentos de pre-tratamiento**

Estos experimentos se llevaron a cabo en las CMSP y las líneas celulares HEC-1A y VK2/E6E7. Primero se trataron las CMSP, las HEC-1A y VK2/E6E7 con los dendrímeros o ligandos a las concentraciones previamente seleccionadas. El tiempo de pre-tratamiento fue de 1 ó 2 horas dependiendo del compuesto utilizado y del experimento (en los pies de figura de cada experimento se especifican tanto las concentración como los tiempos utilizados). Posteriormente, se infectaron las células con los distintos aislados del VIH-1 a concentración determinadas para cada tipo celular, durante un tiempo de entre 2-3 horas. Tras ese tiempo se lavaron las células 3 veces con PBS estéril y se dejaron en el medio de cultivo. Dependiendo del experimento, se recogió el sobrenadante de los cultivos celulares a 24, 48 y/o 72 horas para posteriormente cuantificar la producción de antígeno p24<sup>gag</sup> por ELISA.

### 3.9.1.2 Experimentos de post-tratamiento

Estos experimentos se realizaron en CMSP. Primero, se infectaron las células con los aislados del VIH-1 durante 2-3 horas. Posteriormente se lavaron 3 veces con PBS estéril, se dejaron en medio de cultivo y se trataron con los dendrímeros y ligandos a las concentraciones correspondientes para cada experimento (se especifica en los pies de figura). Tras 24, 48 y/o 72 horas se recogió el sobrenadante de los cultivos celulares y se cuantificó la producción de antígeno p24<sup>gag</sup> por ELISA.

### 3.9.1.3 Experimentos de internalización del virus

Estos experimentos se realizaron en las líneas celulares HEC-1A y VK2/E6E7, para lo cual, se cultivaron  $2 \times 10^5$  células por pocillo en placas de 12 pocillos. Las líneas celulares HEC-1A y VK2/E6E7 se pre-trataron con los dendrímeros durante 1 hora. Posteriormente se infectaron con los aislados del VIH-1 durante 2 horas. Tras ese periodo de tiempo se lavaron las células con PBS estéril y se lisaron las células con Tritón™ X-100 al 0,2% durante 40 minutos a 4°C. Finalmente, se cuantificó la producción de antígeno p24<sup>gag</sup> del lisado celular por ELISA.

## 3.9.2 Inhibición de la transmisión viral a través de monocapa

Para obtener una monocapa perfecta de células epiteliales HEC-1A y de VK2/E6E7 se cultivaron durante 7 días, con cambio de medio cada 48-72 horas. Se sembraron  $2 \times 10^5$  células en un depósito transwell (soporte de policarbonato permeable de 0,4  $\mu\text{m}$  de poro (Costar, Cambridge, MA)) y se llevaron a cabo medidas de la resistencia eléctrica transepitelial (TER) a los días 1, 3, 7, 8 y 9 para la línea celular HEC-1A como seguimiento de la correcta formación y mantenimiento de la monocapa. Los dendrímeros se añadieron 1 hora antes de la infección (día 7), que se llevó a cabo con los distintos aislados virales VIH-1 a una concentración de 100 ng de VIH/ $10^6$  células. Se recogió el sobrenadante de la cámara inferior a los 30, 60 y 120 minutos posteriores, así como a las 24 horas para llevarse a cabo la posterior cuantificación del antígeno p24<sup>gag</sup> por ELISA.

### 3.9.3 Inactivación del VIH-1 mediada por los dendrímeros

Se utilizaron placa de 96 pocillos planos que se trataron con poli-L-lisina durante 1 hora a 37°C. Posteriormente se lavaron las placas con PBS y se incubaron durante toda la noche a 4°C con 4 ng de X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub> y R5 VIH-1<sub>AD8</sub> para asegurar que las partículas virales se pegaban al pocillo. Posteriormente cada pocillo se lavó con PBS para eliminar los restos de los aislados virales y se incubaron los dendrímeros durante 1 hora y se añadieron  $2 \times 10^5$  CMSP activadas a cada pocillo. Tras 72 horas, se recogió el sobrenadante del cultivo y se cuantificó la producción de antígeno p24<sup>gag</sup> por ELISA.

### 3.9.4 Combinación con antivirales de gran actividad

Se llevó a cabo el pre-tratamiento de la línea celular TZM.bl con las combinaciones de dendrímero 2G-S16 y un inhibidor de la fusión celular (MVC) y tres inhibidores de la transcriptasa inversa (EFV, TDF y AZT). Para ello se trataron las células durante 1 hora con los compuestos y posteriormente se infectaron las células con el aislado viral X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub> en el caso de AZT, TDF y EFV y con el aislado R5 VIH-1<sub>AD8</sub> en el caso de MVC. Tras 2 horas en contacto con el virus, se procedió a lavar las células con PBS estéril y se mantuvieron en cultivo durante 24 y 48 horas. Posteriormente, se lisaron las células y se midió la producción viral por luminiscencia en un lector de placas Synergy™ 4..

## 3.10 Citometría de flujo

Se llevaron a cabo ensayos de citometría de flujo para determinar si los dendrímeros alteraban, dentro de las células mononucleares de sangre periférica, los niveles de expresión tanto de los receptores celulares CD4 y CD8, los correceptores CXCR4 y CCR5, así como el grado de activación que pudieran producir los dendrímeros sobre estas poblaciones.

Para el estudio del efecto de los dendrímeros sobre los receptores y correceptores celulares se realizaron tinciones con: anti-CD4-FITC (linfocito T helper), anti-CD8-PC7 (linfocito T citotóxico) (Beckman Coulter, CA.) para los receptores celulares, y CXCR4-APC (correceptor de quimiocinas tipo 4) (Biolegend) y CCR5-PE (correceptor de quimiocinas tipo 5) (R&D Systems) para los correceptores celulares. Para determinar el grado de

activación celular se realizaron tinciones con: anti-CD4-FITC, anti-CD8-PC7, anti-HLADR-ECD (marcador de activación tardía), anti-CD69-PC5 (marcador de activación temprana) y anti-CD3-PE (marcador de superficie celular) (Beckman Coulter, CA.). El marcaje de las células se realizó tras un lavado con PBS y posterior incubación con los anticuerpos correspondientes durante 30 minutos a 4°C. En todos los experimentos de citometría se incluyó un control negativo (no tratado) y un control isotópico de cada color además de los controles de compensación correspondientes a cada color. Todas las muestras se adquirieron por un citómetro Gallios™ de Beckman Coulter y el análisis de las poblaciones linfocitarias se realizó con el software de análisis Kaluza® Flow Analysis Software de Beckman Coulter.

### **3.11 Determinación de la actividad bactericida de los dendrímeros**

La determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) es la base de la medida de la sensibilidad de una bacteria a un determinado antibiótico. La CMI se define como la menor concentración de antibiótico que provoca una inhibición de cualquier crecimiento bacteriano. Es el valor fundamental de referencia que permite establecer una escala de actividad del antibiótico frente a diferentes especies bacterianas.

El método de difusión por disco (o método Kirby-Bauer), en función sobre todo de su comodidad, economía y fiabilidad, es uno de los más utilizados en los laboratorios de todo el mundo, y consiste en inocular sobre la superficie de una placa de agar el microorganismo en estudio, y sobre su superficie se disponen los discos correspondientes a varios antibióticos. Se incuban las placas durante 16-24 horas a 35°C y al cabo de este tiempo se estudia el crecimiento en ellas. Se valora el diámetro de la zona de inhibición que se forma alrededor de cada disco y se compara con las referencias oportunas publicadas por el CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute). Con esta referencia se puede informar si el microorganismo es Sensible, Intermedio o Resistente (S, I, R) a cada uno de los antibióticos ensayados en las placas.

En este caso, donde el interés radica en valorar la capacidad bactericida de una nueva molécula (dendrímeros), lo que se ha realizado ha sido partiendo de distintas cepas de referencia con actividad conocida a distintos antimicrobianos ya comercializados,

someterlos a distintas concentraciones de los dos dendrímeros en estudio los cuales se inocularon directamente sobre discos de papel de filtro estériles que se colocaron en el medio de cultivo ya sembrado con los distintos microorganismos de referencia. La molécula en estudio difunde en el medio en forma radial alrededor de la placa de medio e inhibe el crecimiento del microorganismo en la zona donde su concentración es suficientemente alta. Las áreas de inhibición grandes, en caso de producirse, indica una actividad antimicrobiana más efectiva.

Cepas analizadas:

1. *Escherichia coli* (infecciones intestinales y extraintestinales) ATCC: 25922: agar Mueller Hinton, Ref. 770305
2. *Proteus vulgari* (infecciones urinarias) ATCC: 49132: agar Mueller Hinton, Ref. 770305
3. *Klebsiella pneumoniae* (infecciones del tracto urinario) ATCC: 700603: agar Mueller Hinton, Ref. 770305
4. *Enterococcus faecalis* (infecciones de vejiga, próstata, epidídimo) ATCC: 29212: agar Mueller Hinton, Ref. 770305
5. *Lactobacillus* (presentes en el tracto gastrointestinal y en la vagina): agar Sangre Columbia, Ref. 770418
6. *Gardnerella* (produce vaginosis; rotura o alteración microflora vaginal): agar Sangre Columbia, Ref. 770418
7. *Neisseria gonorrhoeae* (ETS): agar Chocolate VCA3, Ref. 43611

Discos de concentraciones estériles: Difco Lab. Ref. 677139

### **3.12 Efecto de los dendrímeros sobre el epitelio vaginal de ratonas**

Se analizó el efecto de los dendrímeros en ratonas de la cepa CD-1a (CrI: CD-1(ICR)BR) (Charles river, France). Se hicieron frotis vaginales a las ratonas, se seleccionaron las que estaban en ciclo estro y se les inocularon 30  $\mu$ L de cada uno de los dendrímeros en PBS estéril a concentraciones de 10 y 100  $\mu$ M en las vaginas. A las 2 y 24 horas se sacrificaron las ratonas, se extrajeron las vaginas y se fijaron en formaldehído al 10%. Se utilizaron tres ratonas por condición. El estudio anatomopatológico lo realizó la empresa *anaPath*

(Granada, España) acreditada por la ISO 9001:2008. En las vaginas se valoraron las lesiones epiteliales considerando la existencia de hiperplasia o hiperqueratosis, ulceración y/o presencia de infiltrado inflamatorio en el epitelio. También se valoró la presencia de infiltrado de células inflamatorias, congestión vascular y edema presentes en la submucosa y tejido muscular bajo el epitelio. Los valores asignados fueron 0: sin lesiones; 1 lesión mínima; 2: lesión leve; 3: lesión moderada; 4: lesión intensa. Los procedimientos descritos fueron realizados acordes con la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y el Real Decreto 1201/2005, y fueron aprobados por el comité de ética en experimentación animal del Hospital General Universitario Gregorio Marañón.

### **3.13 Efecto del pH en la actividad de los dendrímeros**

Se estudió el efecto que distintos pH pudieran tener sobre los dendrímeros, con el objetivo de estudiar si la actividad anti-VIH de los dendrímeros se mantenía tras haber sido estos expuestos a concentraciones ácidas de pH. Para ello, se trataron los dendrímeros durante 1 hora a distintas concentraciones de pH. Posteriormente se trataron las células TZM.bl durante 1 hora con los correspondientes dendrímeros y se llevó a cabo la infección con el aislado viral X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub> durante 2 horas. Tras ese tiempo se lavaron las células con PBS estéril y se dejaron en medio de cultivo. Tras 24 y 48 horas se lisaron las células y se cuantificó la infección mediante un lector de placas Synergy™ 4 (Biotek).

### **3.14 Modelado computacional**

Los modelos por ordenador en 3D de las interacciones entre las estructuras de los dendrímero, la proteína gp120 del VIH-1 y CD4, fueron realizados en la Facultad de Ciencias de la J.E. Purkinje University utilizando el método descrito por Chonco et al.<sup>104</sup>

Estos modelos en 3D de las estructuras de los dendrímeros se crearon usando un “constructor” de estructuras de dendrímeros, utilizando el software “Materials studio software package” de Accelrys Inc. Los residuos individuales de dendrímero se crearon utilizando la herramienta “Antechamber”, que es un componente del propio software.<sup>245</sup> Para el cálculo de las cargas parciales se utilizó el enfoque AM1-BCC.<sup>246-247</sup> El campo de fuerza “Generalized Amber Force Field” (GAFF), que se utiliza comúnmente para las

simulaciones no estándar de Amber (las moléculas estándar en este caso son las proteínas y ácidos nucleicos), se eligió para las simulaciones de los dendrímeros.<sup>248</sup> Los términos de las pérdidas de los enlaces/ángulo/torsión que contienen átomos de silicio se obtuvieron a partir de cálculos QM utilizando software "GAMESS"<sup>249-250</sup> y la rutina "paramfit" desarrollado por Ross Walker.<sup>251</sup> Estos parámetros del campo de fuerza se ajustaron para obtener las mismas energías relativas de los cálculos de mecánica molecular como fueron los obtenidos a partir de cálculos QM de los fragmentos de dendrímeros elegidos. Para los cálculos QM se utilizó el nivel de la teoría MP2/HF/6-31G. Los parámetros de Van der Waals para el Si se tomaron del campo de fuerza MM3.<sup>252</sup> Para las simulaciones de CD4 y gp120 se utilizó la fuerza de campo ff99SB.<sup>149</sup> Las estructuras de CD4 y gp120 se obtuvieron a partir de PDB: para asegurar los correctos estados iónicos de todos los grupos titulables, el 1G9N se procesó utilizando el H++ (que se corresponden con el pH neutro) y así finalmente, añadir los átomos perdidos.<sup>253</sup> En primer lugar se disolvieron en agua los componentes individuales (2G-S16, 2G-C16, 2G-S24P, 2G-C24P, CD4 y gp120) (modelo TIP3P) con el número adecuado de iones Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> para que se preservara la neutralidad del sistema y se garantizase la correcta resistencia iónica (0,15 M).<sup>254</sup> Estos sistemas independientes se redujeron al mínimo (5000 pasos con 2 kcal/(mol Å<sup>2</sup>) + 5000 sin restricciones), se calentó (200 ps NVT) a 310 K y se equilibró (TNP 8 ns). A partir de estos componentes equilibrados se crearon las configuraciones iniciales 2G-C16/CD4, 2G-C16/gp120, 2G-S16/CD4 y 2G-S16/gp120, 2G-S24P/CD4, 2G-S24P/gp120, 2G-C24P/CD4 y 2G-C24P/gp120, utilizando el software "UCSF Chimera", que también se utilizó para la visualización final.<sup>255</sup> Se siguieron los mismos pasos que en el caso de los componentes individuales para los complejos, llevándose a cabo un calentamiento, seguido por 15 ns NPT y, por 29 simulaciones NVT. Los hidrógenos se vieron limitados con el algoritmo "SHAKE" para permitir 2 lapsos de tiempo<sup>256</sup> y se utilizó un termostato de Langevin, con frecuencia de colisión 2 PS-1 para todos los modelajes ejecutados.<sup>29</sup> El tiempo de relajación de la presión del barostato de acoplamiento-débil fue de 2 ps. El método de partículas en malla de Ewald (PME) se utilizó para tratar las interacciones electrostáticas de largo alcance bajo condiciones periódicas con un corte de espacio directo de 10 Angstroms. El mismo punto de corte se utilizó para interacciones de Van der Waals. Para todas las simulaciones se utilizó el módulo "pmemd.cuda" del software "Amber11". Los últimos 400 marcos (que abarcan el final de 4 ns de simulación total) se utilizaron para los análisis energéticos mediante el uso de la metodología de los mecanismos moleculares/área de superficie de Poisson-Boltzmann (MM/PBSA) como implementación al software "Amber11" para obtener las estimaciones de energías libres de unión.<sup>30,257</sup> El radio de la sonda utilizada para el cálculo del área de



superficie accesible al disolvente (SASA) fue de 1,4 Å. Los parámetros  $a$ ,  $b$ , para el cálculo de la contribución del disolvente no polar  $\Delta G_{NP} = a \text{ SASA} + b$ , fueron  $a=0,00542$  y  $b=-1,008$ . La constante dieléctrica del soluto se estableció en 1 y en el caso de disolvente a 80. En este estudio se utilizó un enfoque de trayectoria simple. La asfericidad se calculó como la relación del momento más grande y más pequeño de inercia. Se eligieron los valores promedio de 10 configuraciones equidistantes elegidos de los últimos 4 ns de simulación.

### 3.15 Análisis estadístico

El análisis estadístico realizado sobre los resultados incluye el cálculo de la media, desviación estándar (SD) y valores de  $p$  utilizando un test no paramétrico Mann-Whitney U. Aunque en las gráficas se muestran los valores normalizados al tanto por 100 respecto al control de cada experimento, la estadística se realizó sobre los valores puros. El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).



## ***4. RESULTADOS***



## 4. RESULTADOS



Los resultados se han dividido en cuatro secciones. En la primera sección se estudia el efecto de los dendrímeros de estructura carbosilano aniónicos 2G-C16 y 2G-S16, con el objetivo de investigar si la combinación del dendrímero 2G-S16<sup>104</sup> con el 2G-C16 potencian el efecto de inhibición de la transmisión del VIH-1 y por tanto el efecto protector o microbicida. En la segunda sección, con el objetivo de desarrollar nuevos dendrímeros que lleven unidos en la periferia complejos metálicos que potencien su actividad antiviral se estudian cuatro familias de ligandos polianiónicos con núcleo de etilendiamina y sus complejos metálicos derivados. Estos compuestos podrían considerarse, en analogía a los dendrímeros, como complejos de “generación 0”, que permiten determinar el comportamiento de los dendrímeros y metalo-dendrímeros de generaciones mayores.<sup>258</sup> En la tercera sección, con el objetivo de analizar si tienen una mayor inhibición frente al VIH-1 se estudia el uso de dendrímeros carbosilano aniónicos con complejos metálicos de cobre en la periferia. En la cuarta y última sección, se aborda el estudio de la actividad antiviral de dos dendrímeros de núcleo polifenólico y grupos carboxilato o sulfonato en la periferia, y dos nuevos dendrímeros carbosilano aniónicos también con grupos carboxilato o sulfonato en la periferia, pero sintetizados con un nuevo método que permitiría una mejor traslación a la clínica.

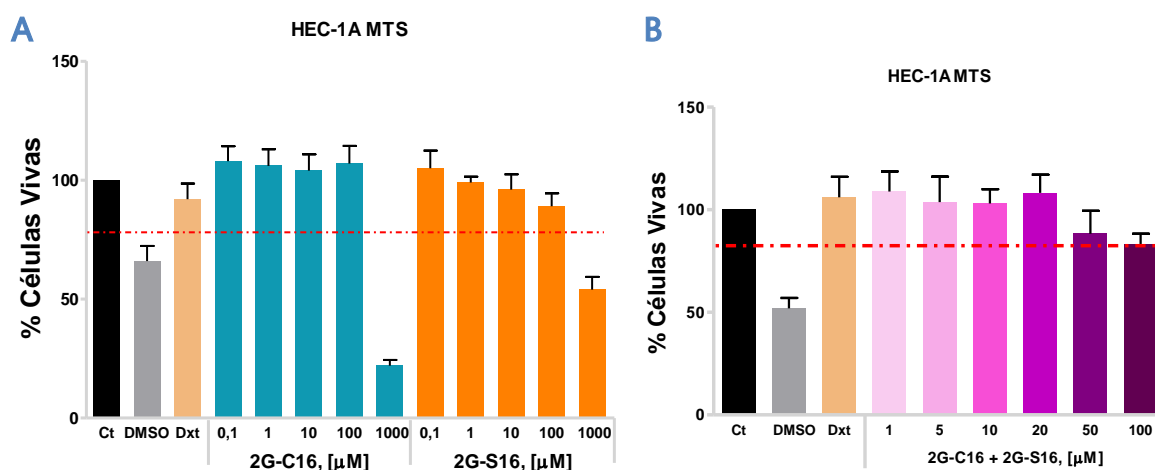
### 4.1 Efecto de los dendrímeros aniónicos 2G-C16 y 2G-S16 en la inhibición de la transmisión del VIH-1

El ciclo de replicación del VIH-1 tiene varios pasos que pueden ser dianas terapéuticas.<sup>257</sup> Los compuestos polianiónicos interfieren en los primeros pasos del ciclo, en la unión y la fusión celular.<sup>190-191</sup> En este proceso, la gp120 de la envoltura del VIH-1 interactúa, a través de sus regiones V3 y V4, con los receptores CD4, CXCR4 y CCR5 expresados en la superficie de la célula huésped. Los compuestos polianiónicos bloquean esta unión inhibiendo la unión del VIH-1 a las células y la entrada del VIH-1, y la formación de sincitios.<sup>258</sup> Estos primeros pasos del ciclo viral son puntos clave de tratamiento para algunos complejos metálicos o compuestos orgánicos que contienen metales.<sup>257</sup> Debido a la experiencia previa del laboratorio con el dendrímero 2G-S16<sup>104,259</sup> y en el efecto de los anti-retrovirales en terapia combinada, se estudió si la combinación de dos dendrímeros

carbosilano aniónicos de segunda generación, uno con grupos periféricos sulfonato (2G-S16) y otro con grupos periféricos carboxilato (2G-C16) podrían tener mayor efectividad como microbicida tópico frente a la infección por el VIH-1. Para ello se llevaron a cabo ensayos de toxicidad e inhibición de la replicación del VIH-1 con los dendrímeros carbosilano aniónicos 2G-S16 y 2G-C16 en la línea celular HEC-1A (como modelo para la primera barrera celular contra la infección por VIH-1 en el epitelio vaginal) y en las CMSP (diana principal del VIH-1, como modelo de segunda barrera celular contra la infección por el VIH-1).

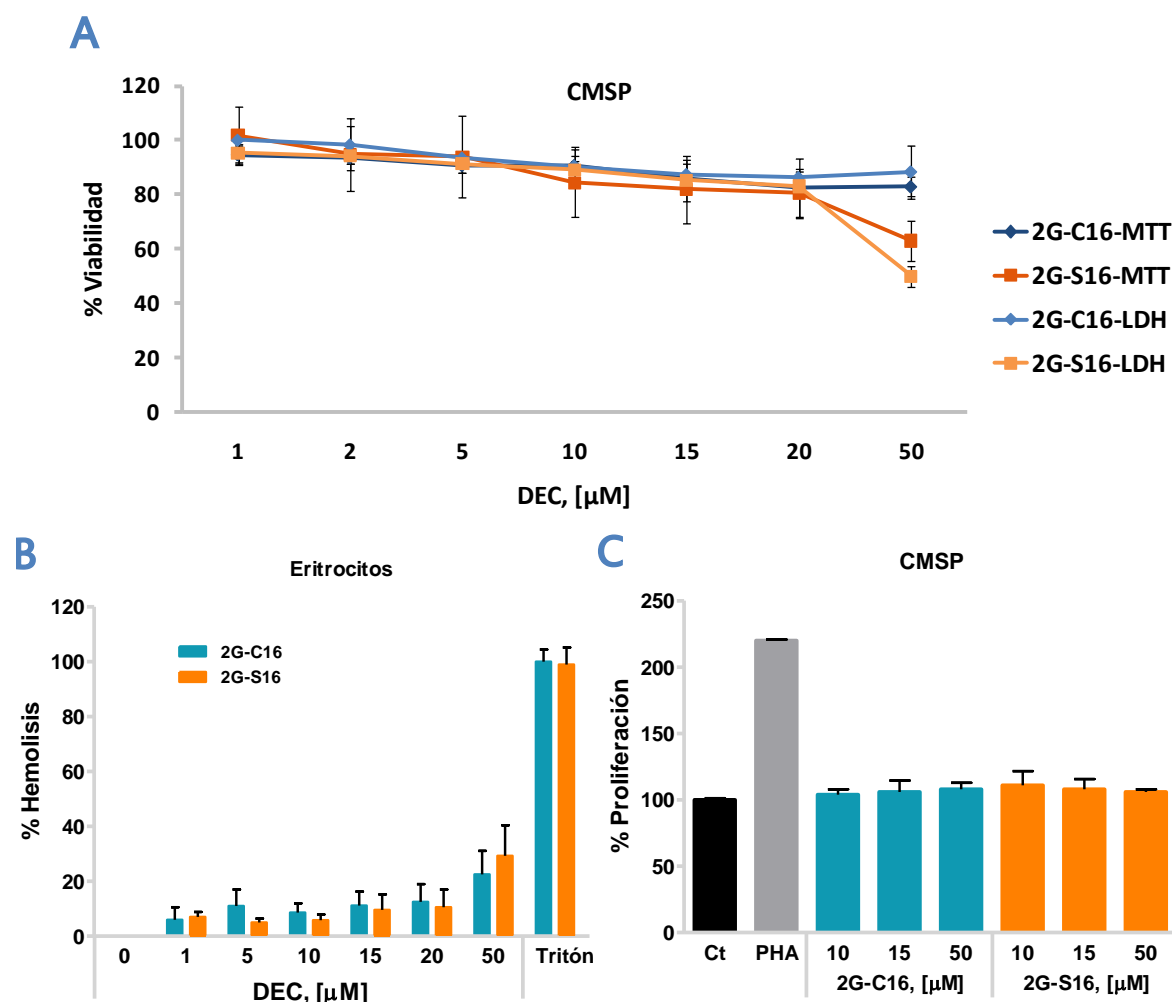
#### 4.1.1 Estudio de toxicidad

En primer lugar se estudiaron las concentraciones a las cuales los dos dendrímeros de segunda generación con núcleo de silicio con grupos carboxilato (2G-C16) y sulfonato (2G-S16) no producían toxicidad en la línea celular HEC-1A de forma independiente y combinados por un ensayo MTS. En ambos casos no se observó toxicidad de los dendrímeros hasta la concentración de 100  $\mu\text{M}$ , cuando se utilizaron de forma independiente o en combinación (Figura 12).



**Figura 12. Viabilidad de la línea celular HEC-1A utilizando el ensayo MTS.** A | Efecto por separado de los dendrímeros en la línea HEC-1A. Las células se trataron a las concentraciones de 0,1, 1, 10, 100 y 1000  $\mu\text{M}$  de los dendrímeros, para ver el efecto de estos sobre la viabilidad celular. Ct, células sin tratar; DMSO (10%), control positivo de muerte celular; Dxt (Dextrano 10  $\mu\text{M}$ ), control negativo de muerte celular. B | Efecto de los dendrímeros en combinación en la línea HEC-1A. Las células fueron tratadas a las concentraciones 1, 2, 5, 10, 15, 20 y 50  $\mu\text{M}$  de la combinación de los dos dendrímeros para analizar el efecto de éstos sobre la viabilidad celular. La viabilidad fue medida a 24 horas. Ct, células sin tratar; DMSO (10%), control positivo de muerte celular; Dxt (Dextrano 10  $\mu\text{M}$ ), control negativo de muerte celular.

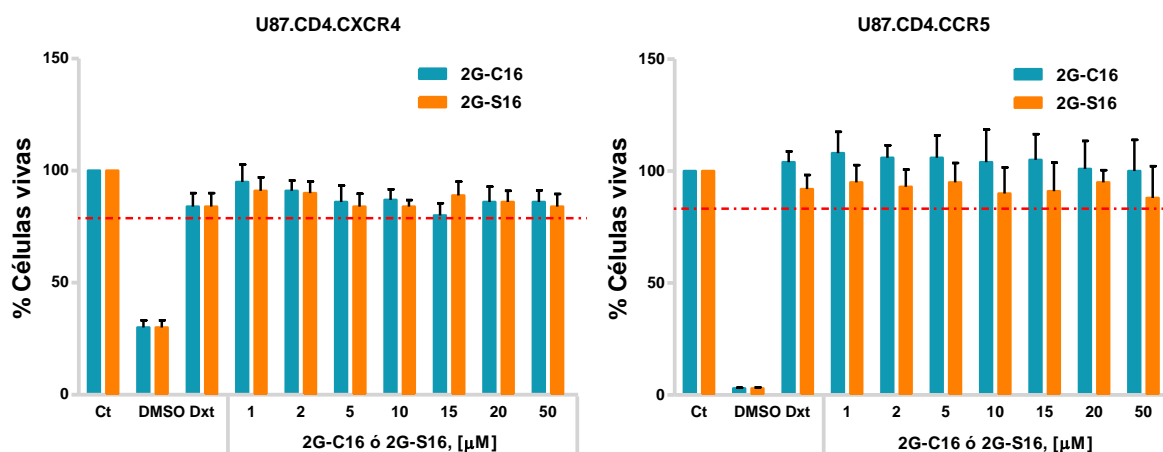
En segundo lugar se estudió la toxicidad de los dos dendrímeros 2G-C16 y 2G-S16 en CMSP y eritrocitos utilizando los ensayos de MTT y LDH. En las CMSP los dendrímeros no fueron tóxicos hasta la concentración de 50  $\mu\text{M}$  en el caso del 2G-C16 y de 20  $\mu\text{M}$  para el 2G-S16 (Figura 13A).



**Figura 13. Biocompatibilidad de los dendrímeros 2G-C16 y 2G-S16.** A | Ensayo de toxicidad analizado por el método MTT y LDH en CMSP de los dendrímeros 2G-C16 y 2G-S16. Las células fueron tratadas a distintas concentraciones de los dendrímeros durante 24 horas. Las dosis utilizadas de los dendrímeros fueron 1, 2, 5, 10, 15, 20 y 50  $\mu\text{M}$ . B | Ensayo de liberación de hemoglobina en eritrocitos tratados durante 1 hora, utilizándose Tritón X-100 al 0,2% como control positivo. C | Ensayo linfoproliferativo analizado a los 4 días. Ct, células sin tratar; PHA a 2  $\mu\text{g/mL}$  control positivo de proliferación.

Sin embargo, en los eritrocitos la concentración de 20  $\mu\text{M}$  fue tóxica para ambos dendrímeros (Figura 13B). También se estudió si estos dendrímeros *per se* tenían algún efecto sobre la proliferación de las CMSP, y no se observó ningún efecto de los mismos sobre la proliferación celular a ninguna de las concentraciones utilizadas (Figura 13C). La

toxicidad de los dendrímeros 2G-C16 y 2G-S16 también se estudió en las líneas celulares U87.CD4.CCR5 y U87.CD4.CXCR4 porque la infección por el VIH-1 puede deberse a aislados virales R5, X4 o mixtos R5X4. No se observó toxicidad de los dendrímeros en ambas líneas celulares a ninguna de las concentraciones estudiadas (1 a 50  $\mu$ M) (Figura 14).



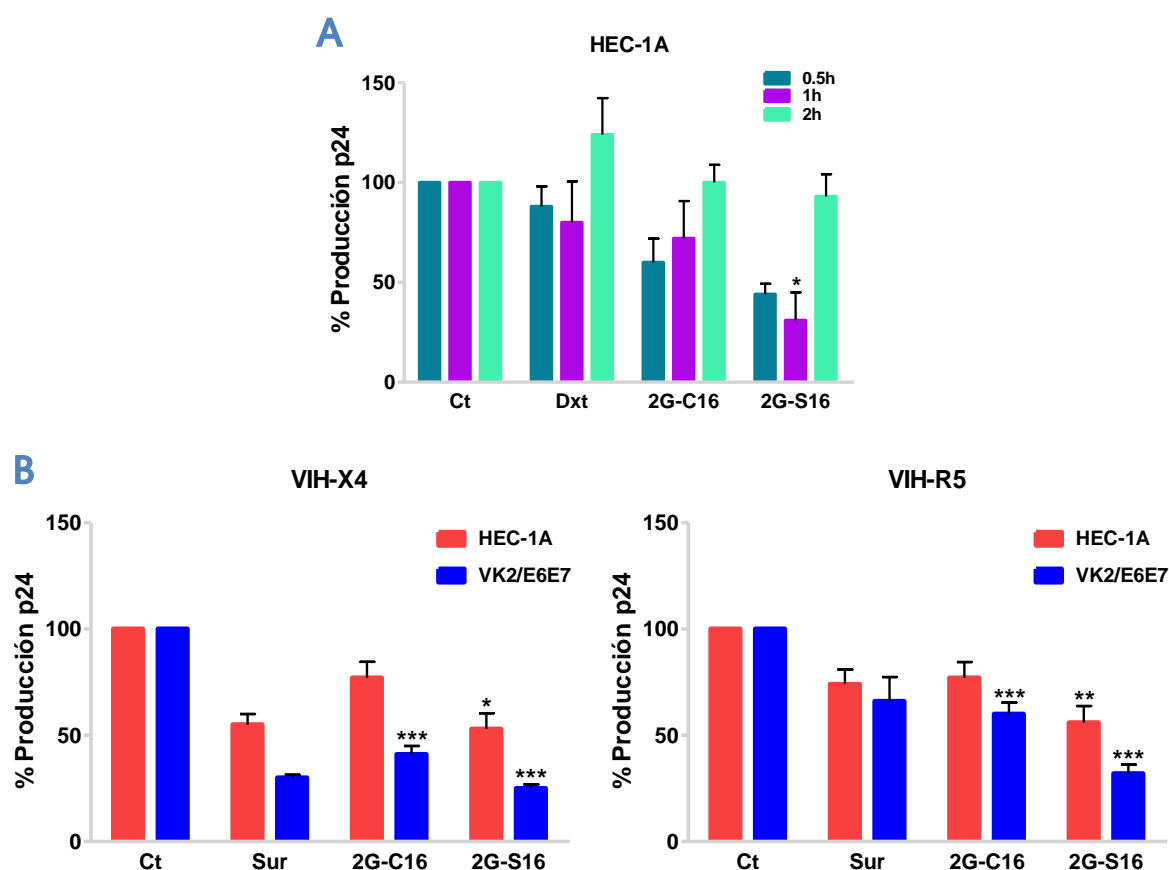
**Figura 14. Viabilidad de las líneas celulares U87.CD4.CXCR4 y U87.CD4.CCR5 utilizando el ensayo MTS.**

Las células se trataron a distintas concentraciones de cada dendrímero por separado para analizar el efecto de esto sobre la viabilidad celular. La viabilidad fue mediada a las 24 horas. Las concentraciones utilizadas de los dendrímeros fueron 1, 2, 5, 10, 15, 20 y 50  $\mu$ M. Ct, células sin tratar; DMSO (10%), control positivo de muerte celular; Dxt (Dextrano 10  $\mu$ M), control negativo de muerte celular.

#### 4.1.2 Ensayos de inhibición del VIH-1

En primer lugar se pre-trataron las HEC-1A con los dendrímeros 2G-C16 y 2G-S16 a distintos tiempos (0,5, 1 y 2 horas) y transcurridos esos tiempos se infectaron con el aislado X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub> (prevención o profilaxis). Los resultados mostraron que ambos dendrímeros producían inhibición de la infección por el VIH-1 en la línea celular HEC-1A. Aunque esta, sólo fue estadísticamente significativa cuando se pre-trataron las células durante 1 hora con el dendrímero 2G-S16. Como también se observó disminución de la infección por el VIH-1 con el 2G-C16 a 1 hora de pre-tratamiento, se seleccionó el tiempo de 1 hora para el pre-tratamiento con los dos dendrímeros en el diseño de los siguientes experimentos (Figura 15A). El siguiente paso fue estudiar si los dendrímeros mostraban especificidad sobre virus X4 ó R5. En primer lugar se pre-trataron las líneas celulares HEC-1A y VK2/E6E7 con los dendrímeros a la concentración de 10  $\mu$ M, y posteriormente se infectaron con los aislados virales X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub> y R5 VIH-1<sub>AD8</sub>. Los resultados muestran menor infección por el VIH-1 en ambas líneas celulares comparados con el control (Figura 15B).



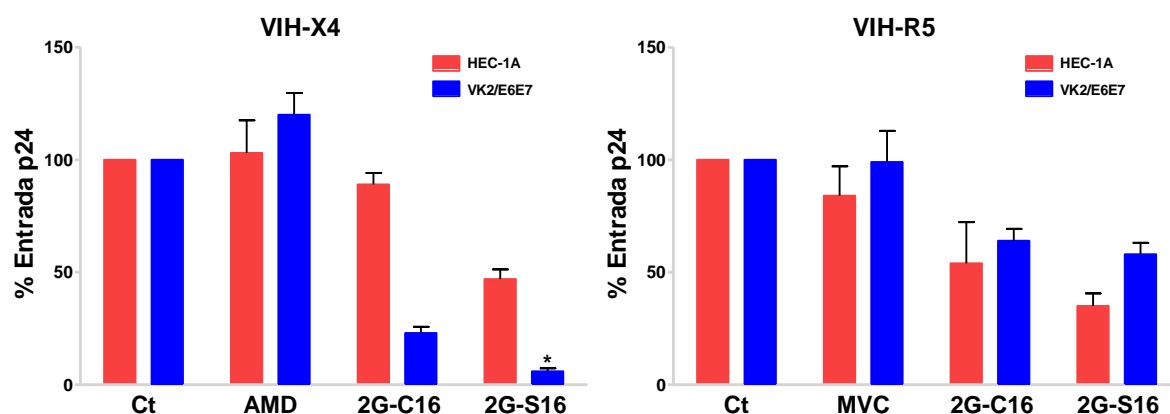


**Figura 15. Pre-tratamiento con los dendrímeros 2G-C16 y 2G-S16.** A | Infección de la línea celular HEC-1A con el aislado viral VIH-1<sub>NL4.3</sub>. Las células fueron tratadas en primer lugar con los dendrímeros a distintos tiempos (0,5, 1 ó 2 horas). A continuación se llevó a cabo la infección con el aislado viral X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub> de las células HEC-1A a una concentración de 200 ng/1x10<sup>6</sup> células. Tras 2 horas en contacto con el virus, se lavaron las células con PBS estéril. Tras 24 horas, se recogió sobrenadante y se cuantificó la producción de antígeno p24<sup>gag</sup> por ELISA. B | Infección de las líneas celulares HEC-1A y VK2/E6E7 con los aislados virales X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub> y VIH-1<sub>AD8</sub>. Primero se trataron las células con los dendrímeros durante 1 hora a una concentración de 10 µM. A continuación se llevó a cabo la infección de las células a una concentración de 100 ng/1x10<sup>6</sup> células. Tras 2 horas en contacto con el virus, se lavaron las células. Tras 24 horas, se recogió sobrenadante y se cuantificó la producción del antígeno p24<sup>gag</sup> por ELISA. Ct, control de células sin tratar; Sur (Suramin, 10 µM), control de inhibición. \*p-valor ≤ 0,05; \*\*p-valor ≤ 0,02; \*\*\*p-valor ≤ 0,01 respecto al control (Ct).

La menor infección fue estadísticamente significativa con el pre-tratamiento con los dendrímeros en la línea VK2/E6E7 para ambos aislados virales, 2G-C16 (59% y 40% de inhibición para virus X4 y R5, respectivamente) y 2G-S16 (75% y 68% de inhibición para virus X4 y R5, respectivamente). Sin embargo, en la línea HEC-1A el pre-tratamiento solo con el dendrímero 2G-S16 disminuyó la infección por el VIH-1 de forma estadísticamente significativa para ambos aislados virales (47% y 44% de inhibición para virus X4 y R5, respectivamente), y con el dendrímero 2G-C16 aunque no fue significativo se consiguió una

disminución del 33% para ambos aislados virales. En resumen, el pre-tratamiento con el dendrímero 2G-S16 produjo una mayor inhibición de la infección por el VIH-1 en las líneas epiteliales sobre todo con el aislado viral X4, mientras que el pre-tratamiento con el dendrímero 2G-C16, no mostró preferencia en la disminución de la infección por el VIH-1 con aislados X4 ó R5.

Aunque se desconoce el mecanismo de entrada del VIH-1 en el epitelio del tracto genital femenino, se estudió el efecto de los dendrímeros sobre la entrada del VIH-1 en las líneas celulares epiteliales.<sup>30</sup> Se pre-trataron las líneas celulares con los dendrímeros 2G-C16 ó 2G-S16 durante 1 hora a la concentración de 10  $\mu$ M. Tras ese tiempo, se dejaron las dos líneas celulares en contacto con los aislados virales X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub> y R5 VIH-1<sub>AD8</sub> durante 2 horas. Posteriormente se lisaron las células con Tritón™ X-100 al 0,2% durante 40 minutos a 4°C. Finalmente, se cuantificó la producción de antígeno p24<sup>gag</sup> del lisado celular por ELISA. Los resultados muestran efectos similares a los observados en el apartado anterior, ya que hubo un efecto mayor con el pre-tratamiento de las células VK2/E6E7 del dendrímero 2G-S16 para el virus X4 con una inhibición estadísticamente significativa del 94% de la entrada del VIH-1, y del 53% en el caso de las células HEC-1A (Figura 16).

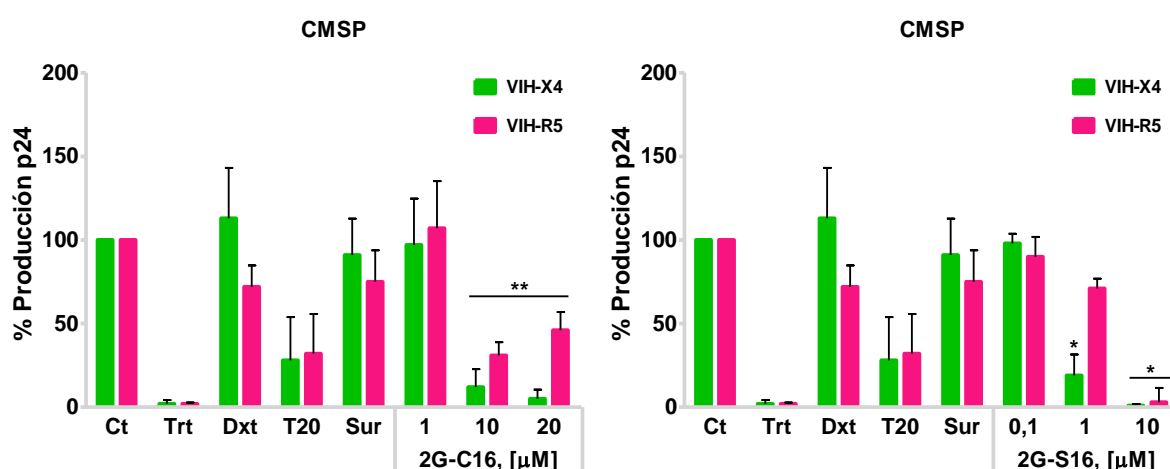


**Figura 16. Internalización del VIH-1 en las líneas HEC-1A y VK2/E6E7.** Las células se trataron con los dendrímeros a la concentración de 10  $\mu$ M para analizar sus efectos sobre la entrada viral. Tras 1 hora de tratamiento con los dendrímeros, se pusieron en contacto las líneas celulares HEC-1A y VK2/E6E7 con los aislados virales X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub> y VIH-1<sub>AD8</sub> durante 2 horas, posteriormente se recogieron las células y se lisaron para cuantificar por ELISA la cantidad de antígeno p24<sup>gag</sup> internalizado en las células. Ct, control de células sin tratar; AMD (AMD3100, 100  $\mu$ M) y MVC (Maraviroc, 10  $\mu$ M) antagonistas de los correceptores CXCR4 y del CCR5 respectivamente. \*p-valor  $\leq 0,05$  respecto al control (Ct).

Lo mismo se observó con el aislado viral R5 (42% y 65% de inhibición de la entrada viral en VK2/E6E7 y HEC-1A, respectivamente) (Figura 16). Estos datos indican que ambos dendrímeros, el 2G-S16 y el 2G-C16 tienen capacidad de inhibición frente al VIH-1 en las células del epitelio genital femenino.

#### 4.1.3 Ensayos de inactivación viral mediada por los dendrímeros 2G-C16 y 2G-S16

Para determinar si el efecto inhibitorio de los dendrímeros sobre el VIH-1 era a través del virus o componentes celulares, se realizó un ensayo de inactivación viral. En primer lugar se pegaron las partículas de X4 VIH-1<sub>NL4-3</sub> y R5 VIH-1<sub>AD8</sub> en plástico y se trataron durante 1 hora con concentraciones seriadas de los dendrímeros. Posteriormente, se lavaron y se añadieron CMSP previamente activadas. Tras 3 días, se cuantificó en el sobrenadante de los cultivos con el X4 VIH-1<sub>NL4-3</sub> y el R5 VIH-1<sub>AD8</sub> la producción de antígeno p24<sup>gag</sup> por ELISA. A la concentración de 10  $\mu$ M se observó una inhibición entre el 97-99% del X4 VIH-1<sub>NL4-3</sub> y R5 VIH-1<sub>AD8</sub> tratados con el dendrímero 2G-S16 (Figura 17).

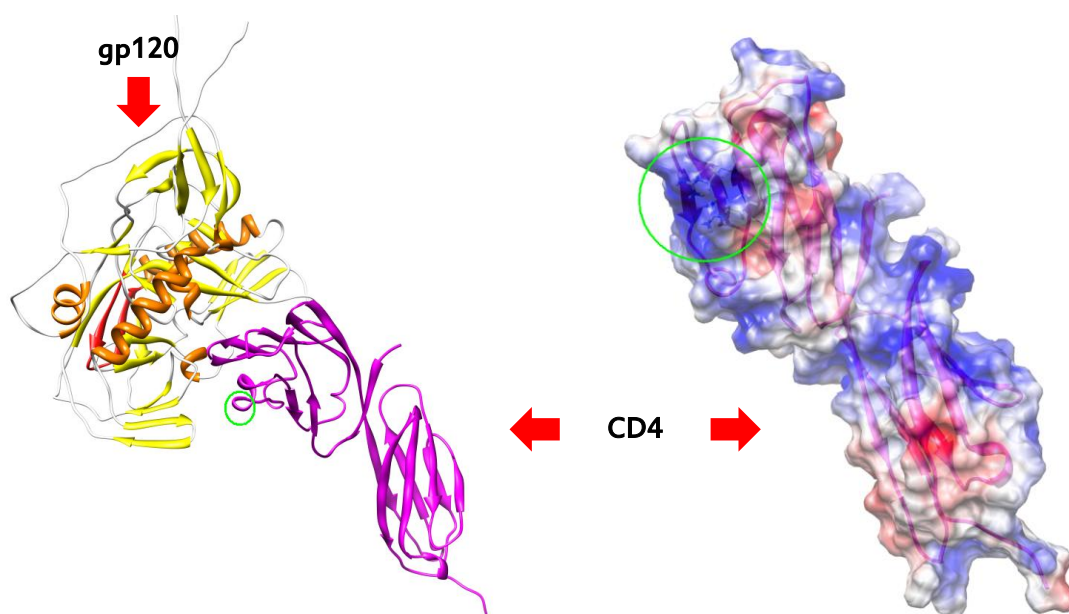


**Figura 17. Inactivación del VIH-1 mediada por los dendrímeros 2G-C16 y 2G-S16 en CMSP.** Se llevó a cabo el tratamiento de una placa de 96 pocillos planos con poli-L-lisina durante 1 hora a 37°C. Tras 3 lavados con PBS, 4 ng de los aislados virales X4 VIH-1<sub>NL4-3</sub> y R5 VIH-1<sub>AD8</sub> se incubaron durante toda la noche a 4°C, para asegurar que las partículas virales se pegaran al pocillo. Posteriormente cada pocillo se lavó para eliminar los restos virales y se incubaron los diferentes dendrímeros durante 1 hora. Se añadieron a cada pocillo  $2 \times 10^5$  CMSP activadas. Tras 72 horas, se recogió el sobrenadante del cultivo para llevar a cabo la cuantificación del antígeno p24<sup>gag</sup> por ELISA. Ct, control de células sin tratar; Trt (Tritón X-100 1%); Dxt (Dextrano 10  $\mu$ M); T20 (20  $\mu$ M); Suramin (Sur 10  $\mu$ M). \*p-valor $\leq$ 0,05; \*\*p-valor $\leq$ 0,02 respecto al control (Ct).

A la misma concentración de 10  $\mu\text{M}$  pero con el dendrímero 2G-C16 se observó una inhibición del 88% para el aislado X4 VIH-1<sub>NL4-3</sub> y del 69% para el aislado R5 VIH 1<sub>AD8</sub>. Estos datos indican que ambos dendrímeros, el 2G-S16 y el 2G-C16 presentan capacidad para inactivar ambos aislados virales.

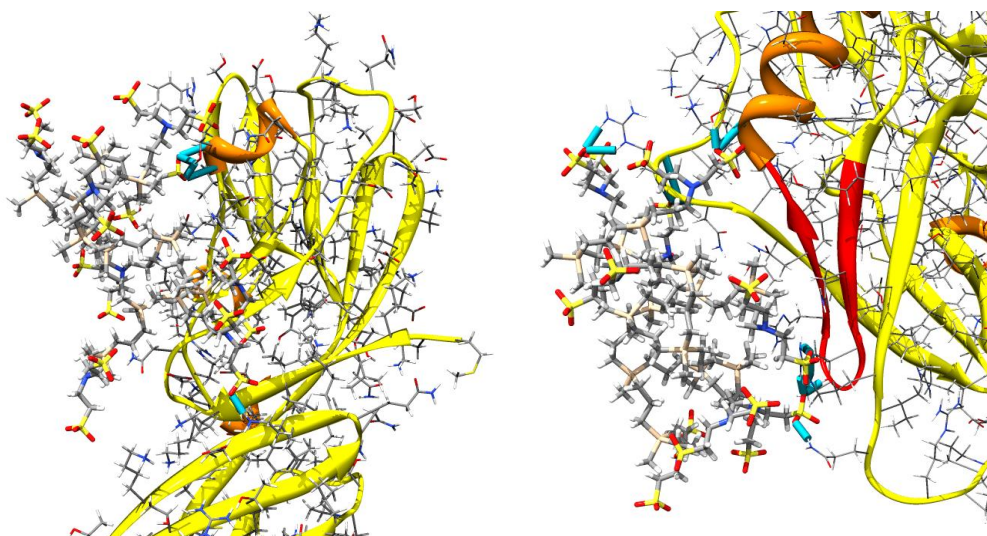
#### 4.1.4 Ensayo de modelado computacional

La mayor parte de las interacciones entre los compuestos polianiónicos y el VIH-1, implican una atracción electrostática entre la gp120 y grupos aniónicos de la periferia de los dendrímeros<sup>256</sup>. La hipótesis sobre el mecanismo de acción anti-VIH de 2G-S16 y 2G-C16 se basó en su capacidad potencial para unirse a la gp120 del VIH-1 y/o al receptor CD4 de las células, y en particular a los sitios de unión para gp120/CD4. Para comprobar esta hipótesis, se realizaron en agua simulaciones atomizadas de dinámica molecular de los complejos de 2G-S16/gp120 y 2G-S16/CD4; 2G-C16/gp120 y 2G-C16/CD4. En la gp120, un sitio interesante fue el bucle V3 de la región variable en su configuración activa que está relacionado con los correceptores, que es junto con la unión al receptor CD4 una etapa crucial de la unión del VIH-1 a la superficie celular. El segundo objetivo fue identificar el área de contacto gp120/CD4 (**Figura 23**).



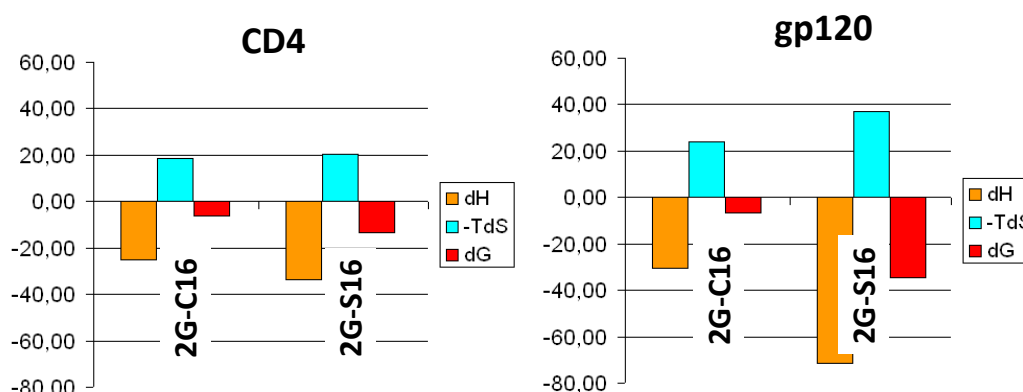
**Figura 23. Complejo gp120/CD4.** En la imagen de la izquierda se puede observar el receptor CD4 representado en color morado y el bucle V3 de la región variable de la gp120 en color rojo. En la imagen de la derecha se representa el CD4 con su superficie molecular coloreada de acuerdo con el potencial electrostático (azul para valores positivos y rojo para valores negativos).

Hay un área catiónica adecuada (principalmente debido a la presencia de 2 argininas) para la interacción favorable con los dendrímeros aniónicos 2G-S16 y 2G-C16 (Figura 24).



**Figura 24. Detalles de la unión de los complejos más estables en cada caso (CD4, Gp120). 2G-S16/CD4 (izquierda), 2G-S16/Gp120 (derecha).** En rojo aparece coloreada el bucle V3 (área importante para la unión de los correceptores), en azul claro se muestran los puentes de hidrógeno y los enlaces de sal. La estructura visualizada es el resultado de 30 ns de simulaciones moleculares dinámicas en agua en presencia de iones  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$  (0,15 M).

En el ensayo computacional se pusieron ambos dendrímeros cerca de las áreas antes mencionadas y las consiguientes simulaciones moleculares dinámicas revelaron que tanto el dendrímero 2G-S16 como el 2G-C16 se podían unir a estas zonas (Figura 25), aunque el dendrímero 2G-C16, lo hacía de manera menos específica (Figura 25).

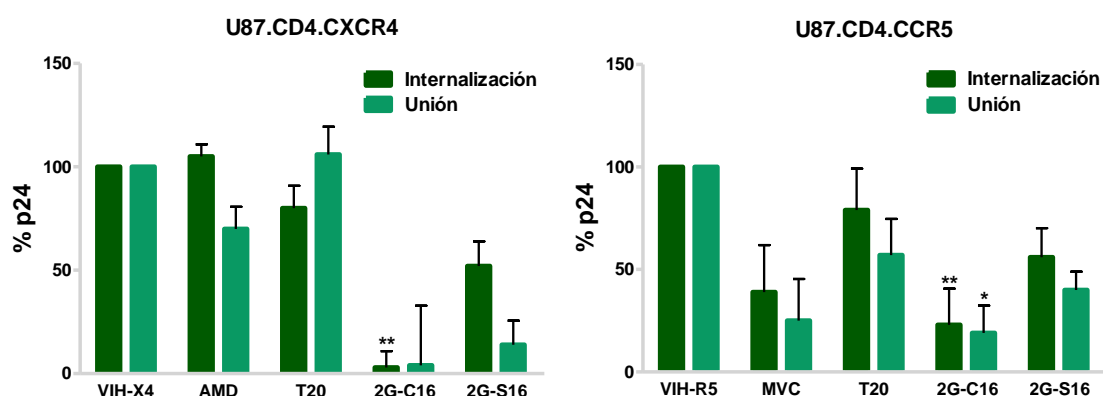


**Figura 25. Resultados de los análisis energéticos utilizando MM / método PBSA.** Unión a CD4 (izquierda), y unión a gp120 (derecha).  $\Delta G = dH - T\Delta S$ , donde la  $\Delta G$  es la energía libre de unión (en rojo),  $dH$  es la entalpía (naranja) y  $T\Delta S$  la entropía (azul) ( $T$  es la temperatura y  $\Delta S$  es el cambio en la entropía debido a la unión). Los valores más negativos de la  $\Delta G$  significa que hay una mejor unión (interacción más favorable).

#### 4.1.5 Ensayo de infectividad mediada por los dendrímeros 2G-C16 y 2G-S16

Se estudió si la pérdida de la infectividad del VIH-1 estaba inducida por alguno de los dendrímeros, debido a un bloqueo en la entrada del virus en las células. Con este objetivo se trataron los aislados virales R5 VIH-1<sub>BaL</sub> y X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub> con los dendrímeros 2G-C16 y 2G-S16 a la concentración de 10  $\mu$ M durante 2 horas, y posteriormente se añadió la combinación de los aislados virales con los dendrímeros a las líneas celulares U87.CD4.CCR5 y U87.CD4.CXCR4, respectivamente.

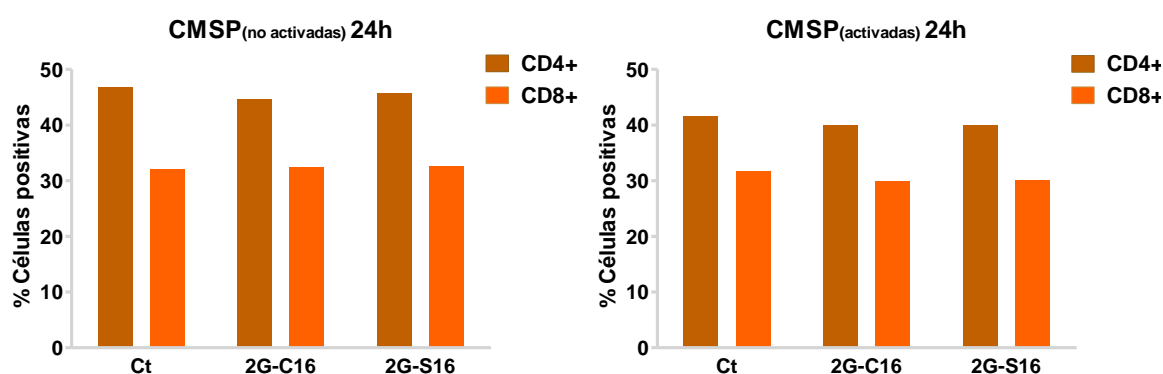
Las células se incubaron a 4°C ó a 37°C durante 2 horas, se lavaron y se lisaron las células con Tritón™ X-100 al 0,2% durante 40 minutos a 4°C. Se cuantificó la producción de antígeno p24<sup>gag</sup> por ELISA unido (4°C) ó internalizado (37°C) en las dos líneas celulares. El porcentaje de virus X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub> ó R5 VIH-1<sub>BaL</sub> unido a las células disminuyó en un 96% y 81% respectivamente, cuando el virus se trató con el dendrímero 2G-C16, y en un 86% y 60% cuando se trató con el 2G-S16 (Figura 26). Se observó disminución similar en la internalización de ambos aislados virales en ambas líneas celulares (Figura 26).



**Figura 26. Efecto de los dendrímeros 2G-C16 y 2G-S16 en la infectividad del VIH-1.** Se incubó el virus con los dendrímeros durante 2 horas y la combinación se añadió a las células. Las células se incubaron a 37°C (para ver internalización del virus en la célula) ó 4°C (para ver unión del virus a la célula) durante 2 horas. Posteriormente se lavaron las células con PBS estéril y se lisaron para cuantificar el antígeno p24<sup>gag</sup> por ELISA. AMD (AMD3100, 100  $\mu$ M) y MVC (Maraviroc, 10  $\mu$ M), antagonistas de los correceptores CXCR4 y CCR5, respectivamente. \*p-valor $\leq$ 0,05; \*\*p-valor $\leq$ 0,02 respecto al control (VIH-R5 ó VIH-X4).

#### 4.1.6 Estudio de los receptores y correceptores celulares en CMSP

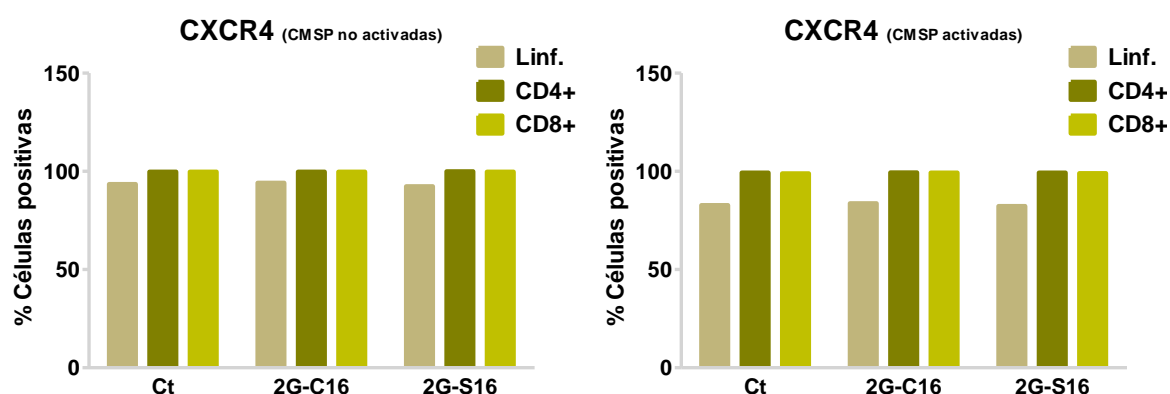
Se llevó a cabo el estudio de la expresión de los receptores celulares en CMSP en estado basal y en CMSP activadas previamente con PHA con el objetivo de analizar si la inhibición del VIH-1 obtenida en los estudios de pre-tratamiento podría ser debida a que los dendrímeros produjeran una menor expresión de receptores CD4 y CD8 celular. Los resultados sobre la expresión de los receptores celulares CD4 y CD8 mostraron que en ningún caso se veían alterados por la presencia de los dendrímeros 2G-C16 y 2G-S16 a la concentración de 10  $\mu$ M en comparación con las células no tratadas o en estado basal y con las previamente activadas con PHA (Figura 27).



**Figura 27. Efecto de los dendrímeros 2G-C16 y 2G-S16 sobre los receptores celulares CD4 y CD8 en CMSP.** Se estudió el efecto que los dendrímeros a la concentración de 10  $\mu$ M pudieran tener sobre CMSP en estado basal o activadas con PHA durante 24 horas. Para ello, se trataron las células con los dendrímeros a la concentración de 10  $\mu$ M durante 24 horas. A continuación, se marcaron las células durante 30 minutos con anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8 para los receptores celulares CD4 y CD8, y se cuantificó la cantidad de células positivas para cada uno de los receptores. Ct, control de células sin tratar.

También se estudió si los dendrímeros disminuían la infección debido a que produjeran una bajada de expresión de los correceptores celulares CXCR4 y CCR5. Los experimentos se llevaron a cabo en CMSP en estado basal o activado durante 24 horas con PHA. Se muestran los resultados obtenidos con el correceptor CXCR4, ya que los resultados obtenidos por citometría de flujo para el correceptor CCR5 fueron nulos y en ningún caso se observó que los dendrímeros interfirieran en la expresión del mismo. Además, en ninguna de las poblaciones estudiadas (linfocitos totales, células T CD4+ y células T CD8+) se mostraron diferencias en la expresión de CXCR4 entre las células tratadas con los dendrímeros 2G-C16 y 2G-S16 en comparación con las células sin tratar, tanto para las que no habían sido

estimuladas, como para aquellas que habían sido previamente estimuladas con PHA (Figura 28).



**Figura 28. Efecto de los dendrímeros 2G-C16 y 2G-S16 sobre el corresponsor CXCR4 en CMSP.** Se estudió el efecto que los dendrímeros pudieran tener sobre CMSP en estado basal o activado con PHA durante 24 horas. Para ello, se trataron las células con los dendrímeros a la concentración de 10  $\mu$ M. Tras 24 horas, se llevó a cabo el marcaje durante 30 minutos con anti-CXCR4 para el corresponsor CXCR4 y se midió la cantidad de células positivas para el corresponsor. Ct, control de células sin tratar.

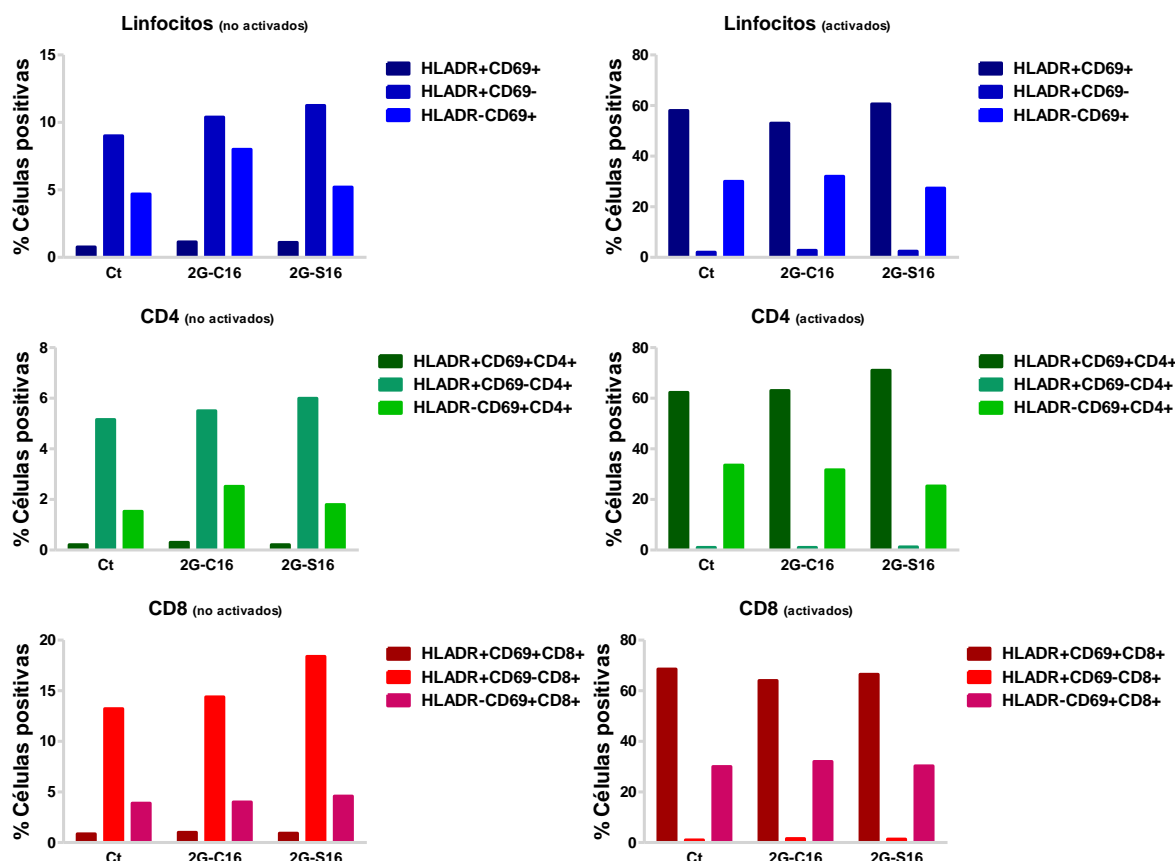
#### 4.1.7 Estudio de la activación celular en CMSP

Se estudió la activación celular mediada por los dendrímeros 2G-C16 y 2G-S16 en CMSP no estimuladas o en estado basal, y en CMSP activadas previamente 24 horas con PHA. Se observó que no se producían variaciones de la activación de las CMSP ni cuando se utilizaron marcadores de activación temprana (HLADR+) ni cuando se utilizaron marcadores de activación tardía (CD69+) en presencia de los dendrímeros, tanto en CMSP en estado basal como en CMSP activadas previamente 24 horas con PHA (Figura 29). Se obtuvieron los mismos resultados en las poblaciones estudiadas (linfocitos totales, células T CD4+ y células T CD8+) de CMSP sin activar o activadas con PHA (Figura 29).

#### 4.1.8 Evaluación de los dendrímeros en vaginas de ratonas CD-1a

Con el objetivo de estudiar si los dendrímeros 2G-C16 y 2G-S16 producían alteraciones en la pared de la vagina, se llevó a cabo un estudio a nivel vaginal en ratonas CD-1a. Los resultados mostraron hiperplasia del epitelio a 24 horas, siendo ésta moderada en dos casos (2G-C16 a 100  $\mu$ M) (Figura 30 y tabla 4).

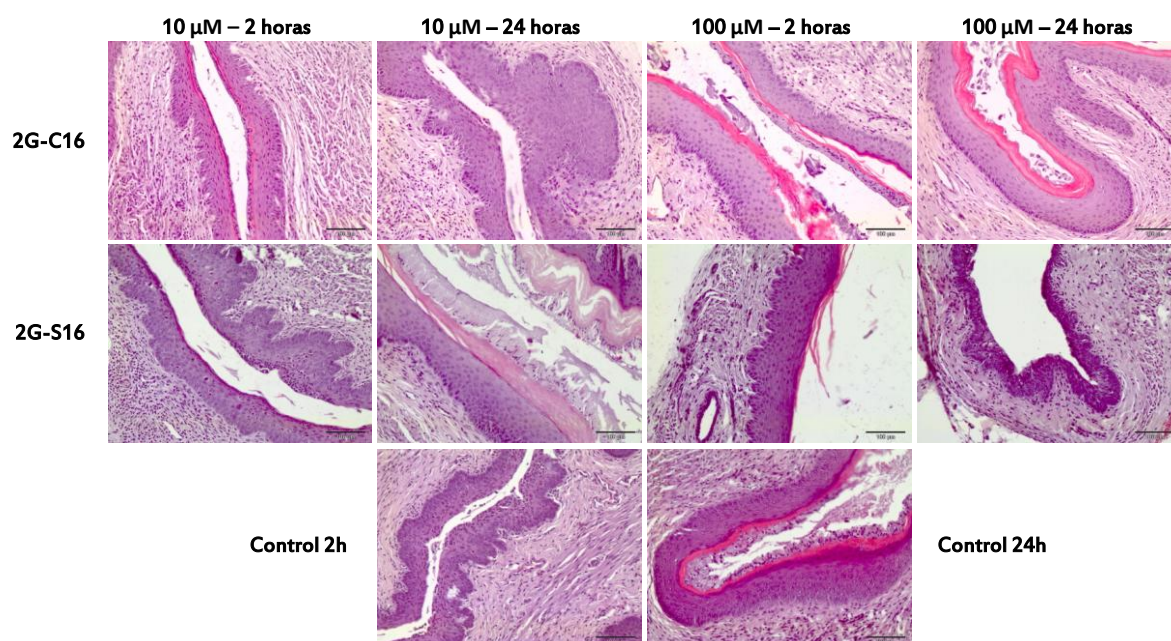




**Figura 29. Efecto de los dendrímeros 2G-C16 y 2G-S16 en la activación de CMSP.** Se estudió el efecto que los dendrímeros pudieran tener sobre la activación temprana y tardía de CMSP en estado basal o activado con PHA durante 24 horas. Para ello, se trataron las células con los dendrímeros a la concentración de 10  $\mu$ M durante 24 horas. Posteriormente se llevó a cabo el marcaje durante 30 minutos con anticuerpos anti-CD4, anti-CD8, anti-CD3, anti-CD69 y anti-HLADR y se midió la cantidad de células positivas para el corresponsor. Ct, control de células sin tratar.

El aumento de grosor del epitelio de la mucosa observado a las 24 horas y con ambas concentraciones en el dendrímero 2G-C16 (Figura 30), junto con la formación de papilas que invaden la submucosa, podría ser el resultado de la acción de un compuesto externo que normalmente suele ser de tipo hormonal o un factor de crecimiento y no causado por el dendrímero. En este caso, se trataría de un proceso mayoritariamente mínimo o leve y que, en ningún caso, rompería la membrana basal que separa la mucosa de la submucosa y que no se acompaña de inflamación ni otros cambios en la pared vaginal. En todo caso, la hiperplasia del epitelio de la mucosa podría estar relacionada con una ligera acción del dendrímero, sobre todo si se tiene actividad hormonal o de factor de crecimiento aunque la intensidad de la lesión fue principalmente de tipo mínimo-leve. En el caso del dendrímero

2G-S16 (Figura 30) no se encontró ningún tipo de lesión en el epitelio vaginal a ninguna de las concentraciones utilizadas ni de los tiempos de desarrollo.



**Figura 30. Evaluación de los dendrímeros en vaginas de ratonas CD-1a.** Se estudió el efecto de los dendrímeros carboxilano aniónicos en la vagina de ratones hembra CD-1a. Se utilizaron dos dosis de dendrímeros (10 y 100 µM) a dos tiempos (2 y 24 horas).

	2G-C16 10µM 2h	2G-C16 100µM 2h	2G-C16 10µM 24h	2G-C16 100µM 24h	Vehículo
Lesión epitelial (0-4)	0	0	1,67 ± 1,53	1 ± 1,73	0
Infiltrado inflamatorio (0-4)	0	0	0	0	0
Congestión vascular (0-4)	0	0	0	0	0
Edema (0-4)	0	0	0	0	0
Puntuación de irritación microscópica	0	0	1,7	1,0	0
Índice de irritación vaginal (0-16)	0	0	1,7	1,0	0

	2G-S16 10µM 2h	2G-S16 100µM 2h	2G-S16 10µM 24h	2G-S16 100µM 24h	Vehículo
Lesión epitelial (0-4)	0	0	0	0	0
Infiltrado inflamatorio (0-4)	0	0	0	0	0
Congestión vascular (0-4)	0	0	0	0	0
Edema (0-4)	0	0	0	0	0
Puntuación de irritación microscópica	0	0	0,0	0,0	0
Índice de irritación vaginal (0-16)	0	0	0,0	0,0	0

**Tabla 4. Valoración del daño tisular.** Se valoró el infiltrado de células inflamatorias, la congestión vascular y el edema presentes en la submucosa y tejido muscular bajo el epitelio. Los valores asignados fueron 0: sin lesiones; 1 lesión mínima; 2: leve; 3: moderada; 4: intensa. En la parte superior se pueden observar los valores dados al dendrímero 2G-C16, mientras que en la parte inferior los valores dados al dendrímero 2G-S16.

#### 4.1.9 Determinación de la actividad bactericida de los dendrímeros 2G-C16 y 2G-S16

Para el desarrollo de un microbicida de uso tópico, debe analizarse la biocompatibilidad de los compuestos en la flora vaginal normal y ETS.<sup>260</sup> En primer lugar se evaluó la toxicidad de los dendrímeros carboxilato aniónicos en la microbiota vaginal normal. Se midió la actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus plantarum*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans* utilizando una prueba de microdilución en caldo de cultivo. No se observó actividad antimicrobiana contra los microorganismos indicados a las concentraciones ensayadas para cualquiera de los dendrímeros (10 y 50  $\mu$ M) (Tabla 5).

	2G-S16	2G-C16
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	3.717 mg/mL	3.717 mg/mL
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	3.717 mg/mL	3.717 mg/mL
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	3.717 mg/mL	3.717 mg/mL
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 14917	3.717 mg/mL	3.717 mg/mL
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	3.717 mg/mL	3.717 mg/mL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 28753	3.717 mg/mL	3.717 mg/mL
<i>Candida Albicans</i> ATCC 10231	3.717 mg/mL	3.717 mg/mL

**Tabla 5. Actividad bactericida de los dendrímeros 2G-S16 y 2G-C16.** Se valoró la actividad antimicrobiana de ambos dendrímeros carboxilato aniónicos, no observándose actividad microbiana para ninguno de los dendrímeros utilizados.

#### 4.1.10 Evaluación de la toxicidad de 2G-C16 y 2G-S16 sobre la movilidad espermática

Se llevó a cabo un ensayo de evaluación de la movilidad espermática tras el tratamiento con los dos dendrímeros por separado o en combinación para estudiar si éstos afectaban la calidad del eyaculado. Los resultados muestran que los dendrímeros por separado a concentraciones de 10  $\mu$ M y 50  $\mu$ M no afectan a la movilidad espermática (Figura 31). Los mismos resultados se observaron cuando se utilizó una combinación de ambos dendrímeros a las concentraciones de 10  $\mu$ M y 20  $\mu$ M (Figura 31). En conclusión la

viabilidad de las células del eyaculado no se vieron afectadas en presencia de los dos dendrímeros solos o en combinación.

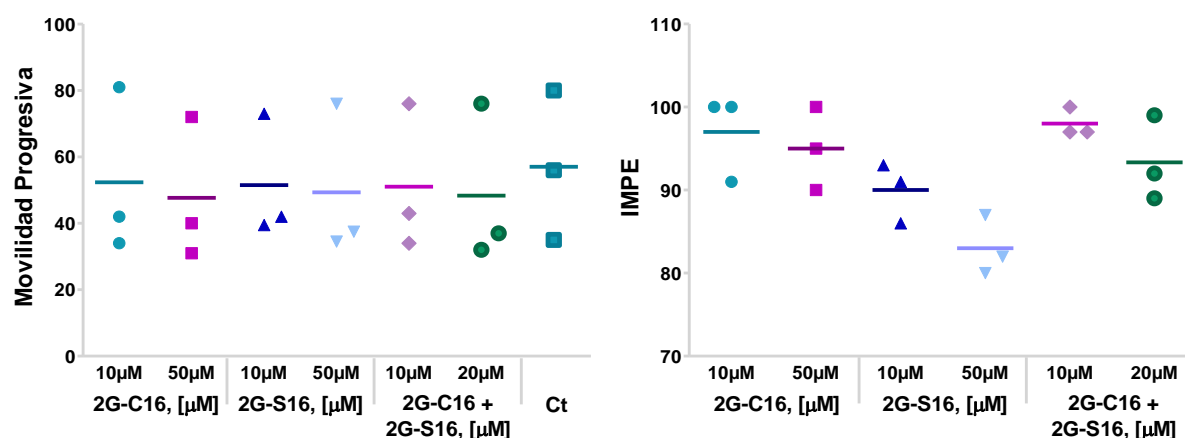


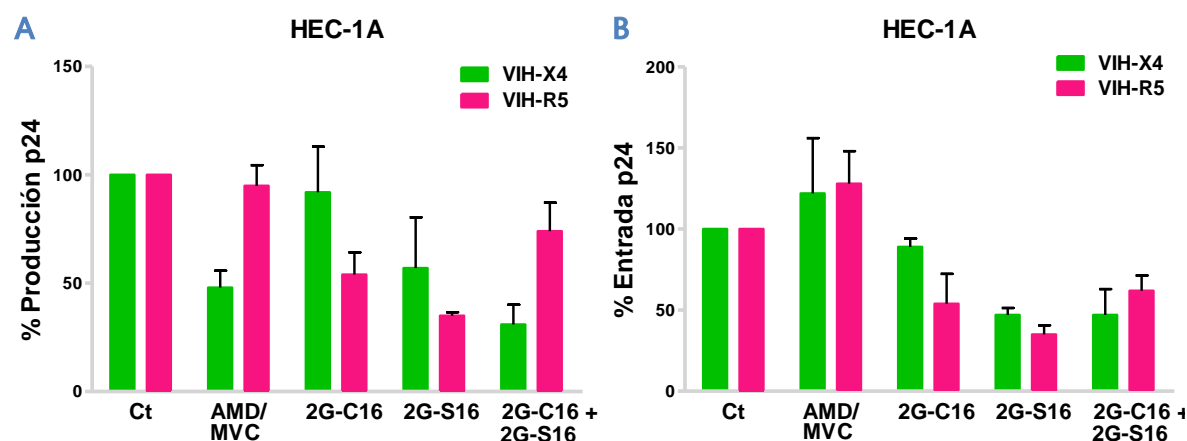
Figura 31. Evaluación de la toxicidad sobre la movilidad espermática. A | Movilidad de los espermatozoides de controles sanos tras la administración in vitro de los dendrímeros 2G-C16 y 2G-S16. B | IMPE (índice de movilidad progresiva espermática). Ct, control de células sin tratar.

#### 4.1.11 Efecto de la combinación de ambos dendrímeros 2G-C16 y 2G-S16 en la infección por VIH-1

Se estudió si la combinación de ambos dendrímeros, 2G-C16+2G-S16, incrementarían el efecto antiviral del pre-tratamiento de las células HEC-1A en comparación con el pre-tratamiento de las células con cada uno de los dendrímeros por separado. Para ello se llevó a cabo un pre-tratamiento de las HEC-1A con ambos dendrímeros por separado y en combinación. Posteriormente se llevó a cabo un ensayo para estudiar el efecto de los dendrímeros solos o en combinación sobre la entrada del VIH-1 en las HEC-1A. En el ensayo de pre-tratamiento cuando se infectaron las células con el aislado X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub> se observó un mayor efecto inhibitor cuando se utilizó la combinación de ambos dendrímeros a la concentración de 10  $\mu$ M (69% de inhibición) en comparación con ambos dendrímeros por si solos (8% para el 2G-C16 y 43% para el 2G-S16) (Figura 18).

No se observó lo mismo cuando se utilizó el aislado viral R5 VIH-1<sub>AD8</sub>, donde la inhibición cuando se utilizaron ambos dendrímeros en combinación fue del 26%, mientras que cuando sólo se utilizó el 2G-C16 fue del 46% o el 2G-S16 del 35%. En el caso del ensayo de inhibición de la entrada del VIH-1 en HEC-1A (Figura 18), se pudo observar un comportamiento similar al obtenido en el ensayo de pre-tratamiento. Utilizando el aislado X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub> se observó un 53% de inhibición tanto con la combinación de los dos

dendrimeros como cuando sólo se utilizó el dendrímero 2G-S16 por si solo, mientras que cuando sólo se utilizó el 2G-C16 se observó un 11% de inhibición. En el caso del aislado viral R5 VIH-1<sub>AD8</sub> cuando se utilizaron los dendrímeros por separado se observó una disminución de la infección de un 46% y 65% para el 2G-C16 y el 2G-S16 respectivamente, la inhibición del efecto combinado de ambos dendrímeros fue del 38%.

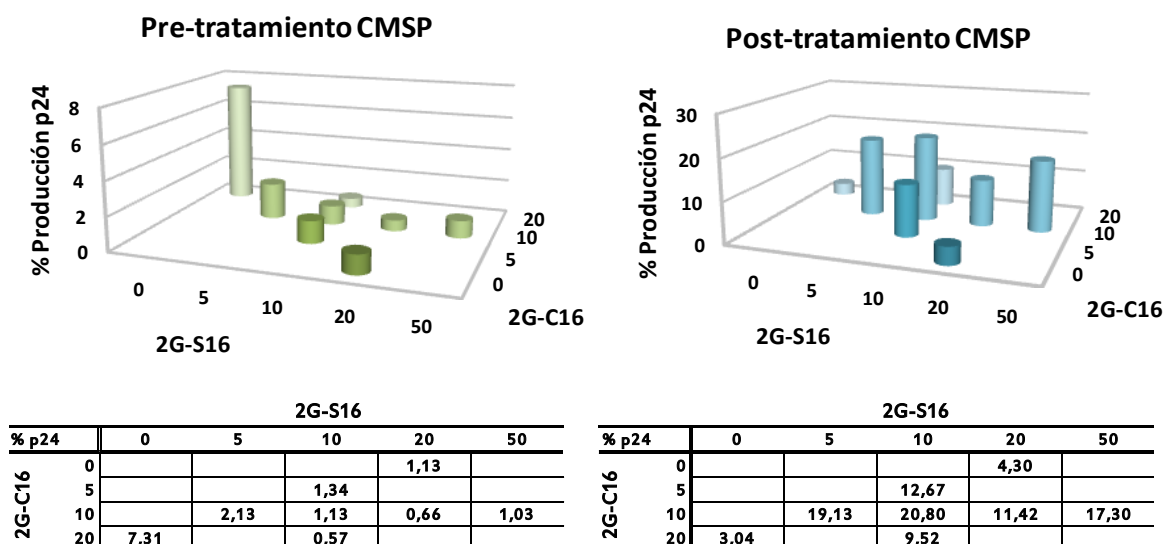


**Figura 18. Efecto de la combinación de los dendrímeros 2G-C16 y 2G-S16 en la línea epitelial HEC-1A. A** | Las células se trataron con los dendrímeros 2G-C16+2G-S16 a la concentración de 10  $\mu$ M durante 1 hora. Posteriormente se infectaron con los aislados virales X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub> y R5 VIH-1<sub>AD8</sub> a una concentración de 100 ng de VIH/10<sup>6</sup> células durante 2 horas. Se lavaron las células con PBS estéril y se dejaron las células en su correspondiente medio de cultivo. A las 24 horas, se recogió el sobrenadante celular y se cuantificó el antígeno p24<sup>gag</sup> por ELISA. **B** | Las células se trataron con los dendrímeros 2G-C16+2G-S16 a concentración de 20  $\mu$ M durante 1 hora. Posteriormente se infectaron con los aislados virales X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub> y R5 VIH-1<sub>AD8</sub> a 100 ng de VIH/10<sup>6</sup> células durante 2 horas. Se lavaron las células con PBS estéril y se procedió a la lisis celular mediante Tritón x-100 0,2% durante 40 minutos a 37°C. Finalmente se cuantificó el antígeno p24<sup>gag</sup> del lisado celular por ELISA. Ct, control de células sin tratar; AMD (AMD3100, 100  $\mu$ M) y MVC (Maraviroc, 10  $\mu$ M) antagonistas de los correceptores CXCR4 y del CCR5, respectivamente.

Para conocer el efecto que ambos dendrímeros pudieran tener en los experimentos de pre-tratamiento o post-tratamiento, se realizaron dos ensayos de infección por el VIH-1 en CMSP (Figura 19).

En el primer experimento se pre-trataron las CMSP durante 1 hora con la combinación de los dos dendrímeros (2G-C16+2G-S16) antes de infectar con el VIH-1, y en el segundo experimento primero se infectaron las células con el VIH-1 y luego se trataron con la combinación (2G-C16+2G-S16) de ambos dendrímeros. En primer lugar se utilizaron distintas concentraciones de la combinación de los dos dendrímeros 2G-S16 y 2C-S16, y se seleccionó la que producía mayor inhibición y no era tóxica. Los resultados muestran que

todas las concentraciones utilizadas disminuían significativamente a valores casi indetectables la producción de antígeno p24<sup>gag</sup> por ELISA, siendo la combinación de las concentraciones de 10  $\mu$ M de 2G-S16 y 20  $\mu$ M de 2G-C16 la que mejor resultado tuvo al comparar los resultados obtenidos en el pre- y post-tratamiento de las CMSP con ambos dendrímeros (Figura 19).

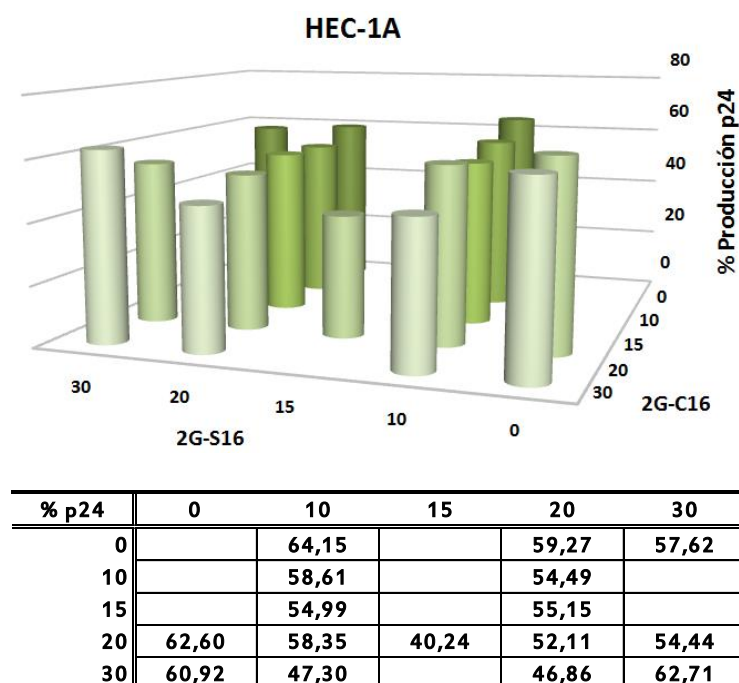


**Figura 19. Efecto conjunto de los dendrímeros 2G-C16 y 2G-S16 en CMSP.** Para estos ensayos se llevaron a cabo dos tipos de tratamientos (pre-tratamiento y post-tratamiento). Primero, se pre-trataron las CMSP a diferentes concentraciones de 2G-C16+2G-S16 durante 1 hora. Posteriormente se infectaron con el aislado viral X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub> a una concentración de 10 ng de VIH/10<sup>6</sup> células durante 2 horas. Se lavaron las CMSP con PBS estéril y se dejaron en su correspondiente medio de cultivo. En el caso del post-tratamiento, primero se infectaron las CMSP con el aislado viral X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub> a una concentración de 10 ng de VIH/10<sup>6</sup> células durante 2 horas. Posteriormente se lavaron las células con PBS estéril y se añadió medio de cultivo y los dendrímeros a las concentraciones correspondientes. A las 72 horas, se recogió el sobrenadante del cultivo celular y se cuantificó el antígeno p24<sup>gag</sup> por ELISA. Aunque no se muestra en la gráfica, todas las muestras resultaron estadísticamente significativas respecto al control de células sin tratar.

Para conocer el efecto de la combinación de ambos dendrímeros en el epitelio vaginal, se estudió la combinación de distintas concentraciones de ambos dendrímeros (2G-C16+2G-S16) cuando se infectaba la línea celular HEC-1A, con el objetivo de seleccionar la combinación de dendrímeros con un mayor efecto inhibitorio (Figura 20).

Aunque no se encontraron diferencias significativas, hubo una tendencia hacia un mayor efecto inhibitorio cuando se utilizaban concentraciones más altas del 2G-C16. A la concentración de 10  $\mu$ M para ambos dendrímeros (la combinación que se había utilizado previamente) el efecto inhibitorio fue del 42%. Sin embargo, cuando se utilizó la

concentración de 30  $\mu$ M del 2G-C16 y 10  $\mu$ M ó 20  $\mu$ M del 2G-S16 el efecto inhibitor fue del 53% y 54%, respectivamente (Figura 15). Pero el efecto inhibitor mayor se observó con la concentración 20  $\mu$ M del 2G-C16, más la concentración 15  $\mu$ M del 2G-S16 (60% de inhibición) (Figura 20).

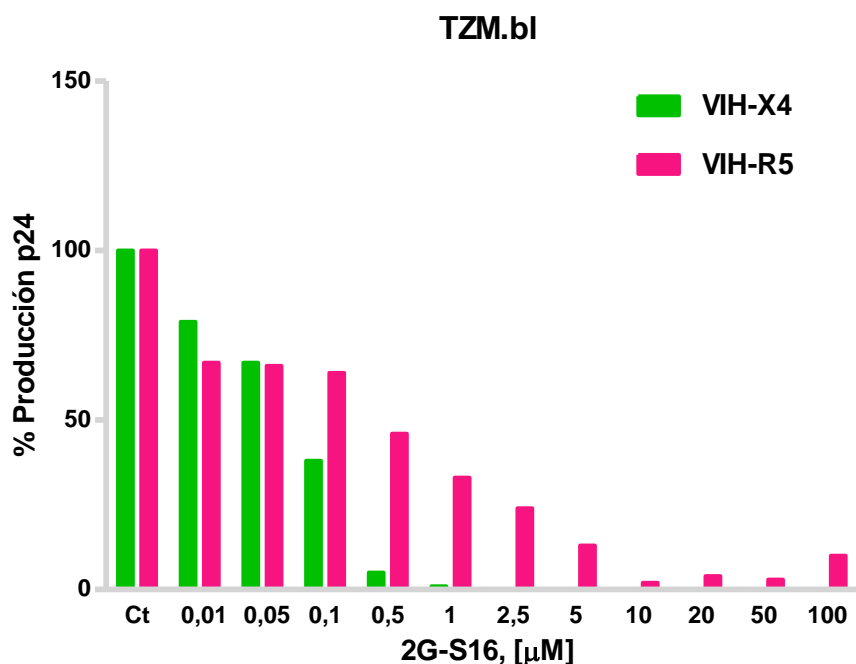


**Figura 20. Efecto conjunto de los dendrímeros 2G-C16 y 2G-S16 en el pre-tratamiento de HEC-1A.** Se pre-trataron las HEC-1 con diferentes concentraciones de 2G-C16+2G-S16 durante 1 hora. Posteriormente se infectaron con el aislado viral X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub> a una concentración de 100 ng de VIH/10<sup>6</sup> células durante 2 horas. Se lavaron las células con PBS estéril y se dejaron en su correspondiente medio de cultivo. A las 24 horas, se recogió el sobrenadante del cultivo celular y se cuantificó el antígeno p24<sup>99</sup> por ELISA.

#### 4.1.12 Efecto de la combinación del dendrímero 2G-S16 con antivirales de gran actividad en la infección por VIH-1

Debido a que el mayor efecto inhibitor venía dado por el 2G-S16, y a que la combinación de ambos dendrímeros no mejoraba significativamente el efecto inhibitor que ambos dendrímeros tenía por separado, se estudió si la combinación del dendrímero 2G-S16 con diferentes antirretrovirales mejoraba la actividad inhibitora del VIH-1. Para ello, se llevó a cabo el pre-tratamiento de las TZM.bl con las distintas combinaciones de los antirretrovirales junto con el 2G-S16. Previamente, se realizó una curva de dosis-respuesta del 2G-S16 (Figura 21) para determinar las concentraciones mínimas a las que se podía

utilizar el dendrímero para la combinación con los antirretrovirales, siendo estas concentraciones la de 0,01, 0,05 y 0,1  $\mu\text{M}$ .

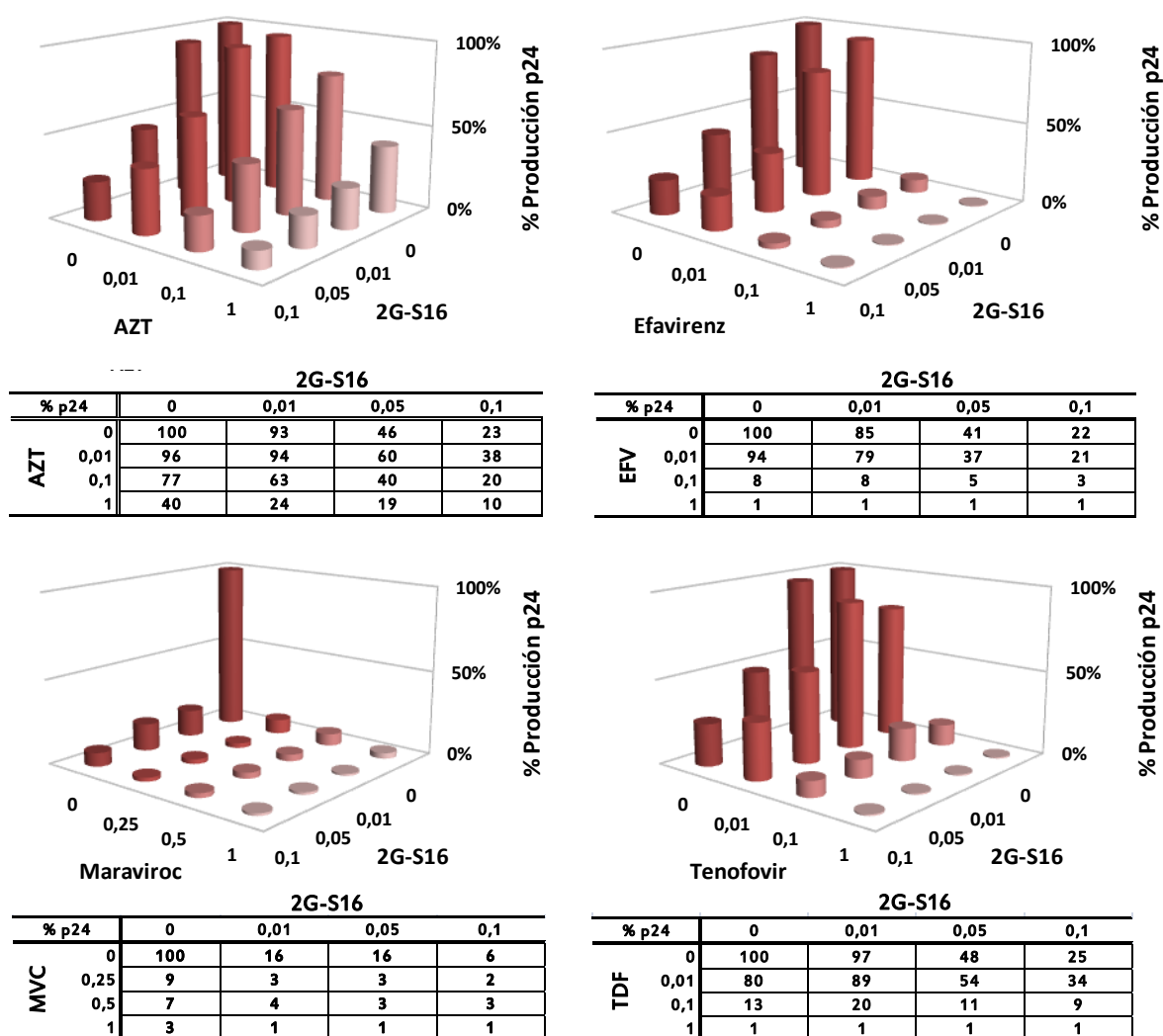


**Figura 21. Curva dosis-respuesta del dendrímero 2G-S16.** Se pre-trataron las TZM.bl con concentraciones crecientes de 2G-S16 durante 1 hora. Posteriormente se infectaron con los aislados virales X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub> y R5 VIH-1<sub>AD8</sub> a una concentración de 10 ng de VIH/10<sup>6</sup> células durante 2 horas. Posteriormente se lavaron las células con PBS estéril y se dejaron en su correspondiente medio de cultivo. A las 24 horas, se recogió el sobrenadante del cultivo celular y se cuantificó la producción viral por luminiscencia.

Los resultados de las sinergias (**Figura 22**) mostraron que el 2G-S16 aumenta el efecto inhibidor de los inhibidores de la transcriptasa, ya que cuando se utilizaron las concentraciones más bajas de inhibidores (0,01  $\mu\text{M}$ ) las tasas de inhibición fueron de 4% (AZT), 6% (EFV) y 20% (TDF), mientras que con la combinación del 2G-S16 a la concentración de 1  $\mu\text{M}$  (10 veces menor de la que se usaba en el resto de ensayos), las tasas de inhibición fueron del 62% (AZT), 79% (EFV) y 66% (TDF).

Por el contrario, en el caso del inhibidor de la entrada, el MVC, los resultaron apenas mostraron un aumento considerable del efecto inhibidor del MVC a concentración más baja (0,25  $\mu\text{M}$ ) por si solo (91% de inhibición) en comparación con el 2G-S16 (98% de inhibición).





**Figura 22. Combinación del 2G-S16 con diferentes retrovirales.** Se llevó a cabo la infección de T2M.b1 previamente tratadas durante 1 hora con la mezcla de los compuestos. Posteriormente se infectaron con el aislado viral X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub> para las sinergias con AZT, EFV y TDF, y con el aislado R5 VIH-1<sub>AD8</sub> para las sinergias con el MVC, a una concentración de 10 ng de VIH/10<sup>6</sup> células durante 2 horas. Se lavaron las células con PBS estéril y se dejaron en su correspondiente medio de cultivo. A las 24 horas, se recogió el sobrenadante del cultivo celular y se cuantificó la producción viral por luminiscencia.

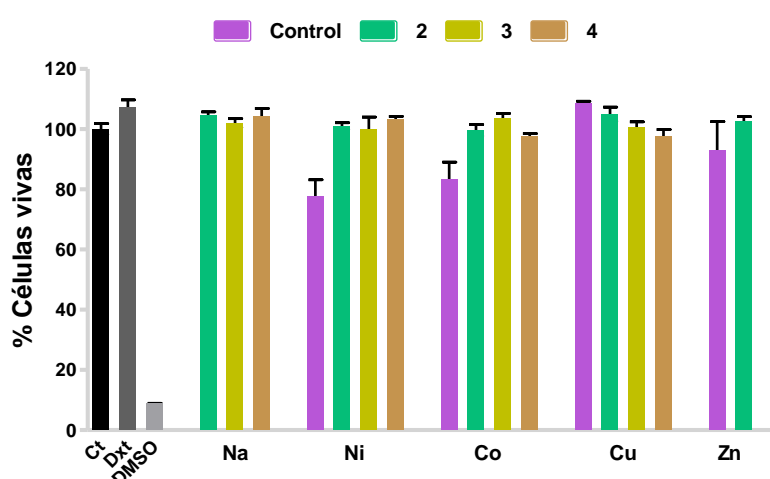
## 4.2 Ligandos polianiónicos

El objetivo de la síntesis de ligandos polianiónicos fue desarrollar nuevos dendrímeros carboxilano que llevasen unidos ligandos metálicos (metaló-dendrímeros) para potenciar la actividad anti-VIH de los dendrímeros carboxilano. Previamente en el grupo de Dendrímeros para Aplicaciones Biomédicas de la Universidad de Alcalá de Henares se realizó la síntesis y caracterización de los ligandos G<sub>0</sub>,<sup>261</sup> a partir de la cual se avanzó hasta la formación de las siguientes generaciones de ligandos y el estudio de sus propiedades anti-

VIH.<sup>102</sup> A partir de ligandos  $G_0$  se desarrollaron nuevos ligandos que llevaban unidos complejos metálicos para potenciar la actividad anti-VIH de los mismos y de esta manera se desarrollaron nuevos dendrímeros carboxilato con complejos metálicos (métalo-dendrímeros) que a su vez potenciasen la actividad anti-VIH de los mismos. Los complejos metálicos del ligando 1 de níquel (1-Ni), cobalto (1-Co), cobre (1-Cu) y zinc (1-Zn) presentaron actividad dual anti-VIH tanto cuando se utilizaron en pre-tratamiento como cuando se utilizaron en post-tratamiento de la infección por el VIH-1. Como continuación de este trabajo, en esta Memoria se pretende determinar si la presencia de metales en los ligandos aniónicos tienen un comportamiento beneficioso y cooperativo en la actividad anti-VIH, y la posible diferencia entre la utilización de ligandos carboxilados y sulfonados, si los hubiese.

#### 4.2.1 Estudio de biocompatibilidad

Para el estudio de toxicidad de los ligandos polianiónicos se realizó el ensayo para medir la actividad metabólica, MTT. Se utilizaron CMSP procedentes de buffy coats y los compuestos se utilizaron a la concentración de  $5\ \mu\text{M}$  a 24 horas. El experimento muestra la ausencia de toxicidad de estos compuestos a  $5\ \mu\text{M}$  en los cultivos de CMSP (**Figura 32**).  $\text{NiBr}_2$  y  $\text{CoCl}_2$  (controles de los complejos de níquel y cobalto) estaban en el límite establecido para la biocompatibilidad (80% de la actividad mitocondrial), mientras que el resto de los complejos mostraron valores por encima del 95%. La ausencia de toxicidad se mantuvo después de 24 horas de tratamiento con los complejos (**Figura 32**).

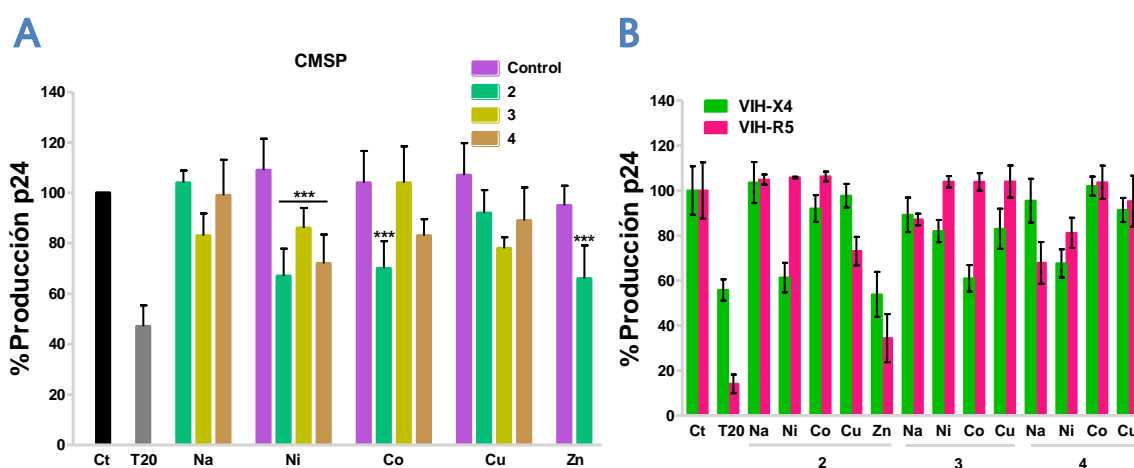


**Figura 32. Viabilidad a 24 horas medida por el método del MTT en CMSP.** Las CMSP se trataron con  $5\ \mu\text{M}$  de los ligandos para analizar el efecto de éste sobre la viabilidad celular. Ct, células sin tratar; Dxt (Dextrano), control negativo de muerte celular; DMSO (10%) control positivo de muerte celular.

### 4.2.2 Ensayos de inhibición del VIH-1

Todos los compuestos se analizaron para determinar la actividad anti-VIH-1. Para discriminar entre un efecto atribuido al ión metálico no acomplexado y la del propio complejo, las eficiencias inhibitorias de los complejos y las sales metálicas  $\text{NiBr}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{CuCl}_2$  y  $\text{ZnSO}_4$ , se compararon bajo las mismas condiciones experimentales.

En primer lugar se estudió el efecto de los compuestos antes de la infección por el VIH-1 en CMSP (pre-tratamiento o profilaxis). Se cultivaron las CMSP y después se incubaron con los compuestos a la concentración de  $5 \mu\text{M}$  durante 2 horas. Posteriormente, se llevó a cabo la infección de las CMSP con el asilado X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub> y después de 48 horas, se recogió el sobrenadante y se cuantificó la producción de antígeno  $\text{p24}^{\text{gag}}$  por ELISA (Figura 33A).



**Figura 33. Infección de CMSP y tratamiento con los ligandos polianiónicos . A** | las células se trataron con  $5 \mu\text{M}$  de los ligandos durante 2 horas para analizar el efecto de estos sobre la transmisión viral. A continuación se llevó a cabo la infección de las células con el aislado viral X4 VIH<sub>NL4.3</sub> a una concentración de  $10 \text{ ng}/1 \times 10^6$  células. Tras 2 horas en contacto con el virus, se lavaron las células con PBS estéril. Tras 48 horas, se recogió sobrenadante y el antígeno  $\text{p24}^{\text{gag}}$  fue cuantificado por ELISA. **B** | El tratamiento en este caso fue igual que en el experimento anterior, salvo que en éste, se utilizaron los 2 aislados virales X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub> y R5 VIH-1<sub>BaL</sub>, para analizar la especificidad de los compuestos. Ct, control de células sin tratar; T-20 ( $20 \mu\text{M}$ ), control positivo de inhibición. \*\*\* $p\text{-valor} \leq 0,01$  respecto a cada control metálico.

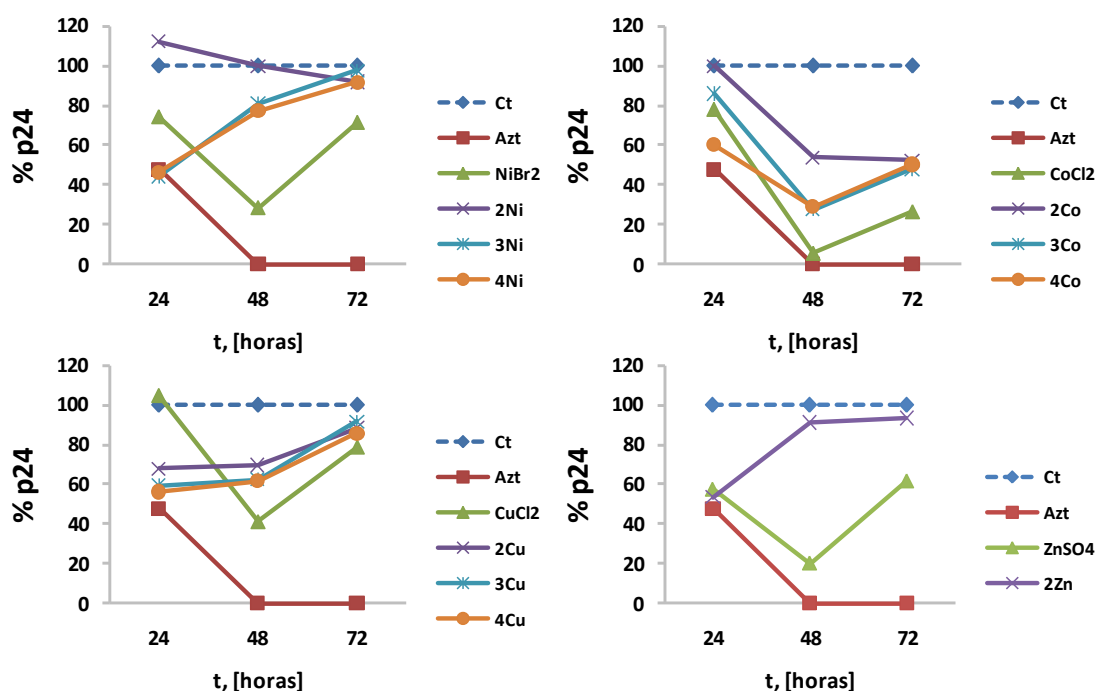
Ninguno de los controles de los metales (barras moradas) mostró inhibición de la replicación del VIH-1 estadísticamente significativa en comparación con las células sin tratamiento (Ct). La inhibición máxima se logró con el antirretroviral T-20 (56%) a concentración  $15 \mu\text{M}$ , que fue tres veces mayor que la de los complejos ( $5 \mu\text{M}$ ). Los

complejos de níquel presentaron una inhibición del 33%, 14% y 28% para el 2-Ni, 3-Ni y 4-Ni, respectivamente. El 2-Co 30%, el 3-Cu 22% y el 2-Zn 34% de inhibición. A excepción del 3-Cu, fueron estadísticamente significativos en comparación con el control de células sin tratar (Ct) y sus controles de metal. Sin embargo, se observó poca inhibición de la infección del VIH-1 cuando las CMSP fueron pre-tratadas con 5  $\mu$ M de 2-Na, 3-Na ó 4-Na en comparación con el control de células sin tratar (Ct). Estos datos indican que los complejos en su forma de sal sódica son casi inactivos.

A continuación se quiso estudiar si los compuestos presentaban especificidad por uno de los correceptores CCR5 y CXCR4. Para ello se llevó a cabo el mismo experimento, pero en este caso con los aislados virales X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub> y R5 VIH-1<sub>BaL</sub> (**Figura 33B**). Algunos de los complejos parecían presentar especificidad para actuar a través del correceptor CXCR4, tal como muestran los datos de los compuestos 2-Ni, 3-Ni y 3-Co; otros por el contrario parecían presentar mayor especificidad por el correceptor CCR5, tal como fue el caso del 2-Cu y 4-Na, y algunos de ellos en ambos, como fue el caso de los complejos 2-Zn ó 4-Ni.

También se estudió el posible efecto terapéutico que los complejos metálicos pudieran tener a lo largo de un periodo de tiempo de 72 horas. Para ello se infectaron las CMSP 2 horas con el aislado viral X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub>, y posteriormente se trataron las CMSP con 5  $\mu$ M de los complejos metálicos, recogiénose sobrenadante a 24, 48 y 72 horas para cuantificar la producción de antígeno p24<sup>gag</sup> por ELISA (**Figura 34**). A 24 horas, la mayor parte de los complejos presentaron una disminución de la infección mayor que sus respectivos controles metálicos, y similar al AZT 1  $\mu$ M utilizado como control de la inhibición. A 24 horas, los complejos metálicos proporcionaron cierto grado de inhibición, a diferencia de las sales sódicas, lo que indica que la presencia del ión metálico coordinado con el ligando es necesaria para producir un efecto inhibidor, y que el ligando mejora el efecto inhibidor del ión metálico solo. Sin embargo, a 48 horas, todos los controles metálicos presentaron una mayor inhibición (desde 60% a 94%, valores similares al obtenido con el AZT en el caso del control metálico del cobalto). Los complejos de cobalto y cobre seguían mostrando una inhibición entre el 60-80% y 30-40% respectivamente, pero menor que sus controles metálicos. Finalmente, a 72 horas, la mayoría de los complejos mostraron un menor efecto, sólo el CoCl<sub>2</sub> (88%) y sus complejos (50-60%) presentaron una inhibición mayor del 20% y en todo caso mejor que el resto de los complejos metálicos. Los ligandos, en su forma de sal sódica, apenas produjeron inhibición. En general, los complejos carboxilados (familias 3 y 4) fueron más eficientes que los sulfonados (familia 2). Para los complejos de Ni, Cu y Zn, la

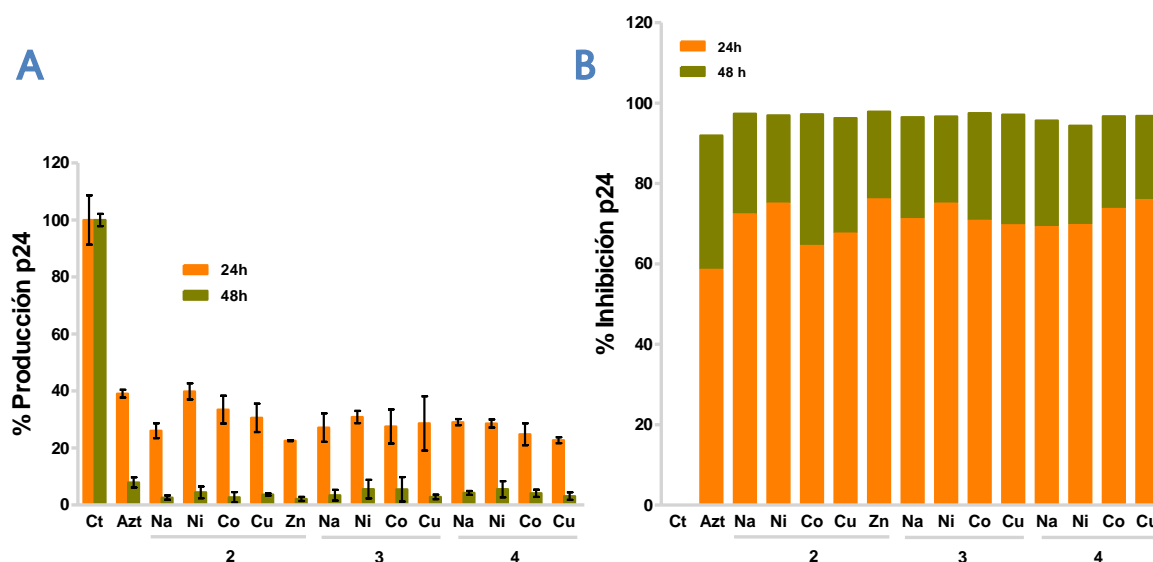
inhibición máxima se logró a 24 horas y su actividad decreció proporcionalmente con el tiempo de exposición al VIH-1, mientras que para los complejos de Co la inhibición máxima se consiguió a las 48 horas de tratamiento, y este efecto se mantuvo a las 72 horas. Estos resultados indican que la coordinación del ligando al centro metálico aumenta su actividad inhibidora y confirma que los complejos son lo suficientemente estables bajo las condiciones experimentales del ensayo.



**Figura 34. Infección de CMSP por VIH-1.** Se llevó a cabo la infección de las CMSP con el aislado viral X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub> a una concentración de 10 ng/1x10<sup>6</sup> células. Tras 2 horas en contacto con el virus, se lavaron las células con PBS estéril. Posteriormente se llevó a cabo el tratamiento con los ligandos a la concentración de 5 µM. Tras 24, 48 y 72 horas, se recogió el sobrenadante y el antígeno p24<sup>gag</sup> fue cuantificado por ELISA. Ct, control de células sin tratar; Azt (1 µM), control de inhibición.

Para analizar un posible efecto sinérgico de los compuestos con un antirretroviral comercial, se repitió el experimento anterior a 24 y 48 horas, tratando las CMSP con una combinación de cada ligando a una concentración de 5 µM + AZT a una concentración de 1 µM. En este experimento, las CMSP fueron infectadas durante 2 horas con el aislado X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub>, y posteriormente se llevó a cabo el tratamiento con los ligandos a la concentración de 5 µM y de AZT a la concentración de 1 µM durante 24 y 48 horas. Posteriormente, se recogió el sobrenadante del cultivo celular y se cuantificó la producción de antígeno p24<sup>gag</sup> por ELISA (**Figura 35A-B**). Este ensayo muestra que a 24 horas se produce un efecto sinérgico debido a que la mayoría de los complejos aumentaron la inhibición de la

replicación del VIH-1 que producía el AZT por sí solo, hasta un 42% como fue el caso del 2-Zn. Incluso las formas de sal sódica de los complejos 2, 3 y 4, que no producían ninguna inhibición por sí mismos, aumentaron aproximadamente un 30% la inhibición que producía el AZT por si mismo A las 48 horas todavía se mantuvo el efecto sinérgico y se mejoró la inhibición de AZT (92% comparado con el control de células sin tratar), alcanzo valores de inhibición de los complejos metálicos de más del 98% con la mayoría de ellos (Figura 35B).



**Figura 35. Efecto sinérgico de los ligandos con AZT en la inhibición del VIH-1.** Se llevó a cabo la infección de las CMSP con el aislado viral X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub> a una concentración de 10 ng/1x10<sup>6</sup> células. Tras 2 horas en contacto con el virus, se lavaron las células con PBS estéril. Posteriormente se llevó a cabo el tratamiento con los ligandos a la concentración de 5  $\mu$ M junto con AZT (1  $\mu$ M). Tras 24 y 48 horas se recogió el sobrenadante y el antígeno p24<sup>gag</sup> fue cuantificado por ELISA. **A |** Datos en porcentaje de producción de antígeno p24<sup>gag</sup>. **B |** Inhibición de la producción de antígeno p24<sup>gag</sup>. Ct, control de células sin tratar; Azt (1  $\mu$ M) control de inhibición.

### 4.3 Métalo-dendrimeros carboxilano aniónicos

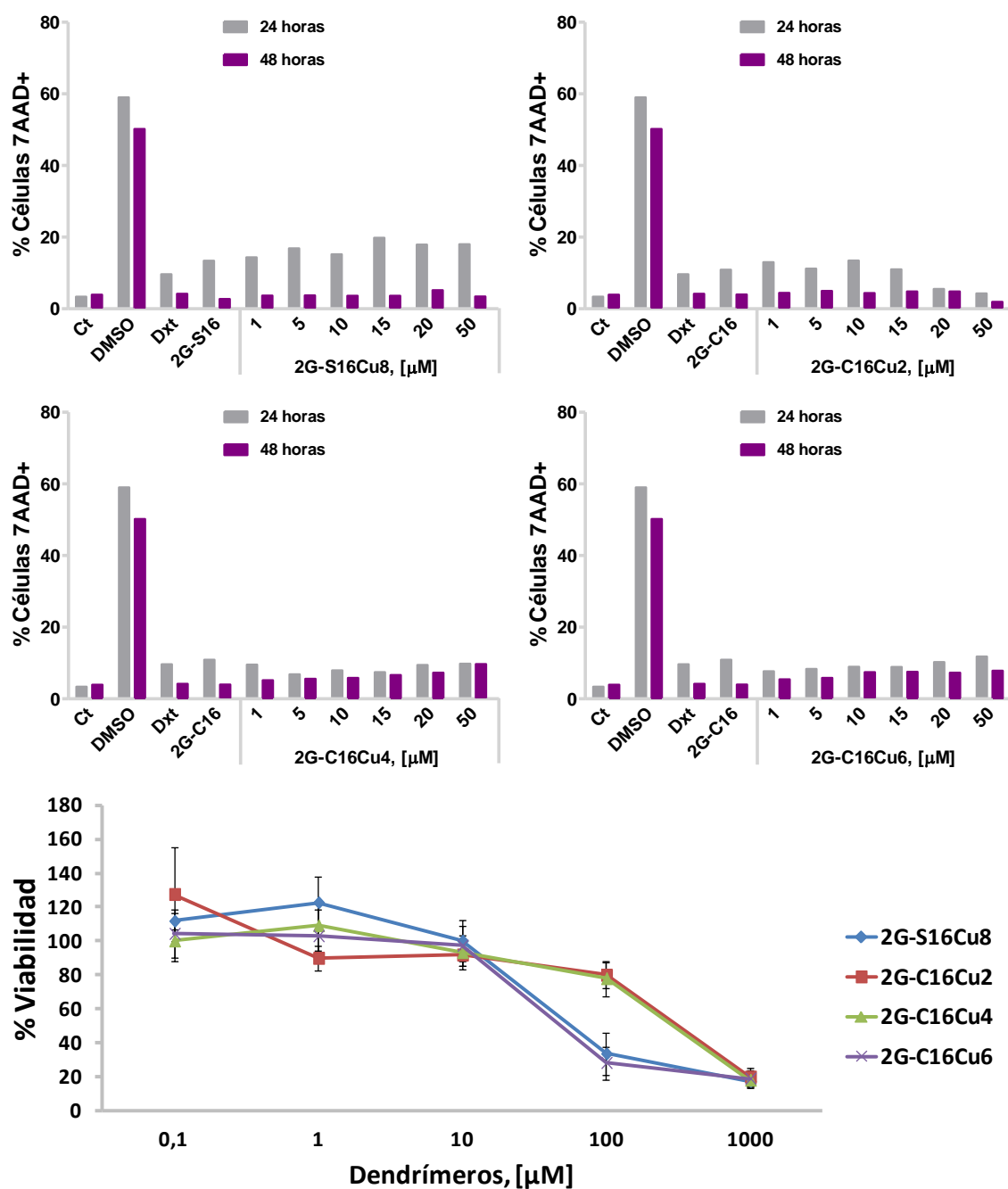
A raíz de los resultados obtenidos en el apartado anterior con los complejos metálicos se llevó a cabo la síntesis de ligandos sulfonados y carboxilados con complejos de metales de transición basados en níquel, cobalto, cobre y zinc, que potenciaran la actividad anti-VIH de los mismos y de esta manera desarrollar nuevos dendrimeros carboxilano con complejos metálicos (métalo-dendrimeros) que a su vez potenciasen la actividad anti-VIH de los mismos. Los ligandos se caracterizaron por análisis de RMN y valoración potenciométrica, los complejos se caracterizaron por UV-Vis, IR, espectroscopía de masas, RMN (si

diamagnético) y espectroscopía EPR para los complejos de cobre.<sup>102</sup> Los resultados y previos análisis de espectroscopía EPR de los complejos de cobre,<sup>102</sup> mostraban que el 3-Cu probablemente fuera el mejor candidato para el desarrollo de una forma dimérica con una geometría distorsionada. Por lo cual se realizaron los ensayos pertenecientes a la tercera sección de esta Memoria, con el fin de continuar probando el comportamiento sinérgico de los complejos metálicos y ligandos polianiónicos, en este caso en métalo-dendrimeros con una estructura carbono-silicio y con complejos metálicos de cobre en su periferia. Algunos compuestos basados en ligandos sulfonados o derivados del biciclám con diferentes metales de transición:  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  o Pd y Pt demostraron previamente ser buenos candidatos para ser utilizados como microbicidas.<sup>262</sup> También se observó que estos metales también actúan a nivel de las enzimas integrasa y proteasa.<sup>263-264</sup> Teniendo en cuenta la combinación de ambas estrategias el objetivo fue encontrar una mayor actividad anti-VIH, que podía ser proporcionada por la presencia de múltiples grupos funcionales, utilizando los dendrimeros carbosilano aniónicos previamente descritos por el grupo<sup>238</sup> unidos a complejos de cobre.

Se realizaron ensayos de toxicidad e inhibición de la replicación del VIH-1 con la segunda generación de compuestos metálicos iónicos con grupos sulfonato y carboxilato unidos con iones de cobre en la periferia, en la línea celular HEC-1A y en las CMSP. Los métalo-dendrimeros utilizados fueron el 2G-S16Cu8, 2G-C16Cu2, 2G-C16Cu4 y 2G-C16Cu6 para evaluar el efecto de un aumento en la cantidad creciente de cobre sobre la toxicidad y/o actividad inhibidora del VIH-1.

#### 4.3.1 Estudio de biocompatibilidad

En CMSP se estudió por citometría de flujo el porcentaje de células apoptóticas o necróticas que habían sido tratadas o no con los métalo-dendrimeros a las concentraciones de 1, 5, 10, 15, 20 y 50  $\mu\text{M}$  a 24 y 48 horas. Los resultados muestran que los métalo-dendrimeros no fueron tóxicos hasta la concentración de 50  $\mu\text{M}$  (**Figura 36A**). En la línea celular HEC-1A se estudió la toxicidad de los métalo-dendrimeros por el ensayo de MTS utilizándose un intervalo de concentración de 0,1-1000  $\mu\text{M}$  a 24 horas. Los resultados muestran que los compuestos no fueron tóxicos hasta la concentración de 10  $\mu\text{M}$  (**Figura 36B**). En resumen, los ensayos de toxicidad mostraron ausencia de toxicidad en CMSP y HEC-1A tratadas con métalo-dendrimeros a concentraciones de hasta 50  $\mu\text{M}$  en las CMSP y hasta 10  $\mu\text{M}$  en HEC-1A.

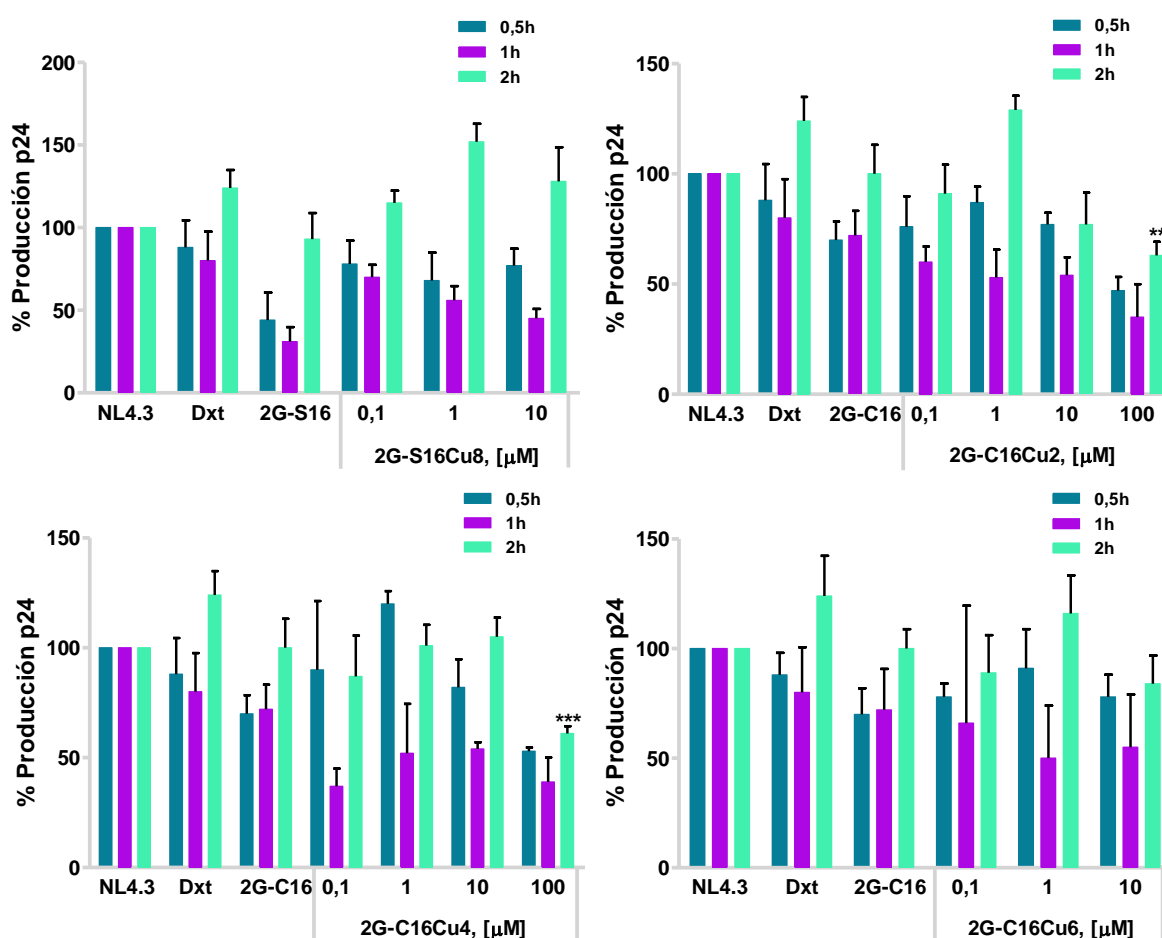


**Figura 36. Efecto de los dendrímeros carboxilano aniónicos unidos a cobre sobre la viabilidad celular. A | Viabilidad de las CMSP. Las CMSP fueron tratadas a distintas concentraciones de metalo-dendrímtero para analizar el efecto de estos sobre la viabilidad celular a 24 y 48 horas. Las dosis utilizadas de los metalo-dendrímteros fueron 1, 5, 10, 15, 20 y 50 μM. Ct, control de células sin tratar; DMSO (20%); Dxt (Dextrano 10 μM) y 2G-C16 ó 2G-S16 (dendrímteros utilizados como control, 10 μM). B | Viabilidad de la línea celular HEC-1A utilizando el ensayo MTS. Las células fueron tratadas a distintas concentraciones de metalo-dendrímtero para ver el efecto de estos sobre la viabilidad celular. La viabilidad fue cuantificada a 24 horas. Las concentraciones de los metalo-dendrímteros utilizadas fueron 0,1, 1, 10, 100 y 1000 μM.**



### 4.3.2 Ensayos de inhibición del VIH-1

Se pre-trataron las células HEC-1A y CMSP con los mévalo-dendrimeros a tres intervalos de tiempos: 0,5, 1 y 2 horas antes de la infección. Posteriormente, se llevó a cabo la infección de las células con el aislado X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub> y tras de 24 horas, se recogió el sobrenadante de los cultivos y se cuantificó la producción de antígeno p24<sup>gag</sup> por ELISA. Los resultados obtenidos en la línea celular HEC-1A se muestran en la **Figura 37**.



**Figura 37. Pre-tratamiento e infección de las HEC-1A con el aislado viral X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub>.** Primero se trataron las células con los mévalo-dendrimeros a distintos tiempos (0,5, 1 ó 2 horas). A continuación se llevó a cabo la infección de las células a una concentración de 200 ng/1x10<sup>6</sup> células. Tras 2 horas en contacto con el virus, se lavaron las células con PBS estéril. Tras 24 horas, se recogió sobrenadante y el antígeno p24<sup>gag</sup> fue cuantificado por ELISA. VIH-1<sub>NL4.3</sub>, control de células sin tratar; Dxt (Dextrano 15 μM). \*\*p-valor ≤ 0,02; \*\*\*p-valor ≤ 0,01 respecto al dendrímero control (2G-C16 ó 2G-S16).

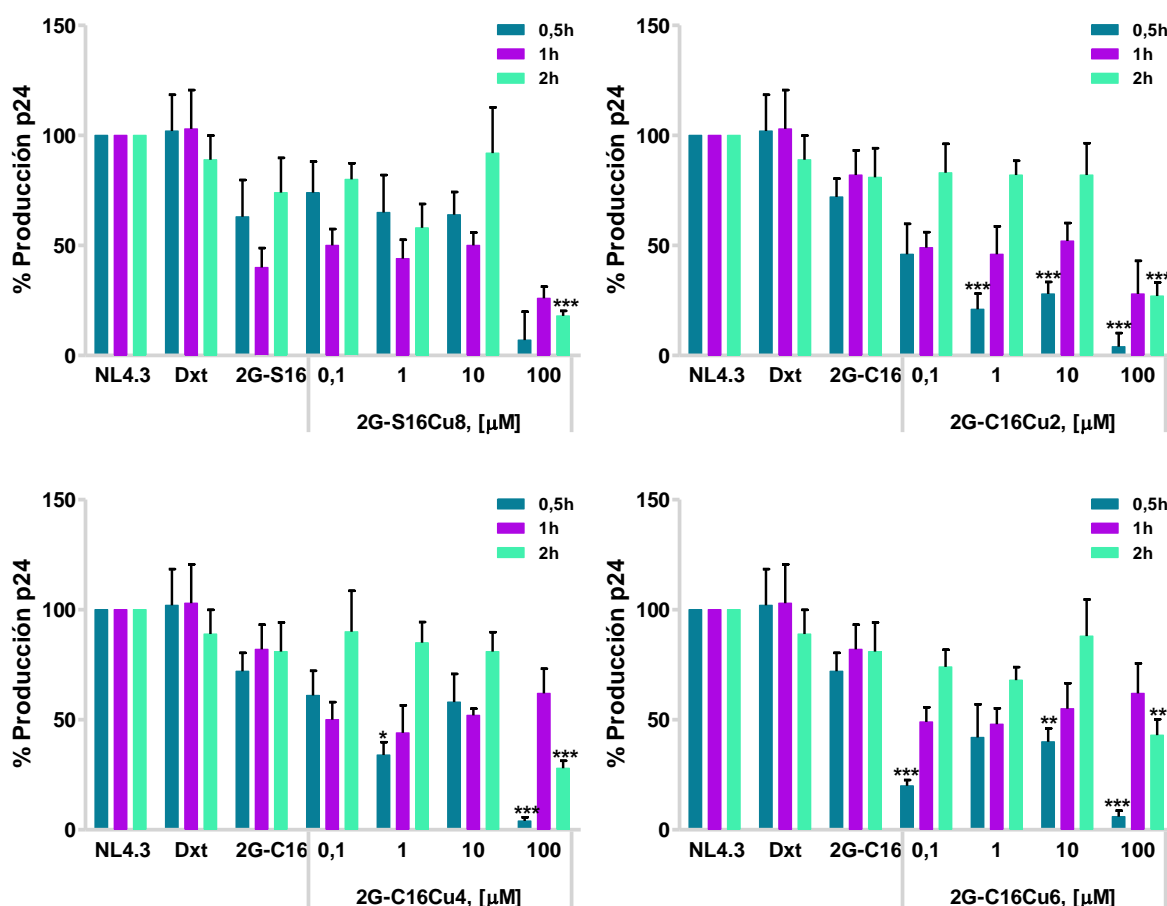
En el caso del mévalo-dendrimeros con grupos sulfonato (2G-S16Cu8), no presentó a ningún tiempo de pre-tratamiento una mayor inhibición que su control (2G-S16). En el caso

de los métalo-dendrimeros con grupos carboxilato, sí se apreció un aumento en la capacidad inhibidora cuando se comparó con el dendrímero control (2G-C16). Aunque a 2 horas de pre-tratamiento, la inhibición fue estadísticamente significativa para los métalo-dendrimeros 2G-C16Cu2 y 2G-C16Cu4 respecto al control 2G-C16, se observó una tendencia hacia un mejor efecto por parte de los tres compuestos, ya que el porcentaje de inhibición fue mayor cuando el pre-tratamiento con los métalo-dendrimeros se llevó a cabo 1 hora antes de la infección por el VIH-1 (**Figura 37**). Puede observarse que la capacidad inhibidora de los métalo-dendrimeros con grupos carboxilato no se vio influenciada por las distintas cantidades de cobre en su periferia. El 2G-C16Cu4 presentó a la concentración más baja (0,1  $\mu\text{M}$ ) una mayor capacidad inhibitoria (63 %), siendo similares los valores para todas las concentraciones.

Los resultados obtenidos en las CMSP fueron similares a los observados en el caso de la línea epitelial HEC-1A (**Figura 38**). En el caso del métalo-dendrímero con grupos sulfonato (2G-S16Cu8), mostró una inhibición estadísticamente significativa a la concentración de 100  $\mu\text{M}$ , pero no así cuando la concentración utilizada fue la misma que la de su dendrímero control (10  $\mu\text{M}$ ). En el caso de los métalo-dendrimeros con grupos carboxilato se observó una inhibición estadísticamente significativa para los tres compuestos a 0,5 y 2 horas de pre-tratamiento, aunque no se observó una diferencia correspondiente a la cantidad de metal unido al dendrímero.

Posteriormente, se estudió el efecto inhibidor de los compuestos tras el post-tratamiento de las CMSP después de la infección por el VIH-1. Para ello, se infectaron las CMSP con el aislado X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub> durante 2 horas. Posteriormente, se lavaron las CMSP con PBS estéril para eliminar las partículas de VIH-1 que no hubieran entrado en las células y se trataron con los métalo-dendrimeros, recogiendo el sobrenadante celular a 24, 48 y 72 horas para cuantificar la producción de antígeno p24<sup>gag</sup> por ELISA (**Figura 39**).

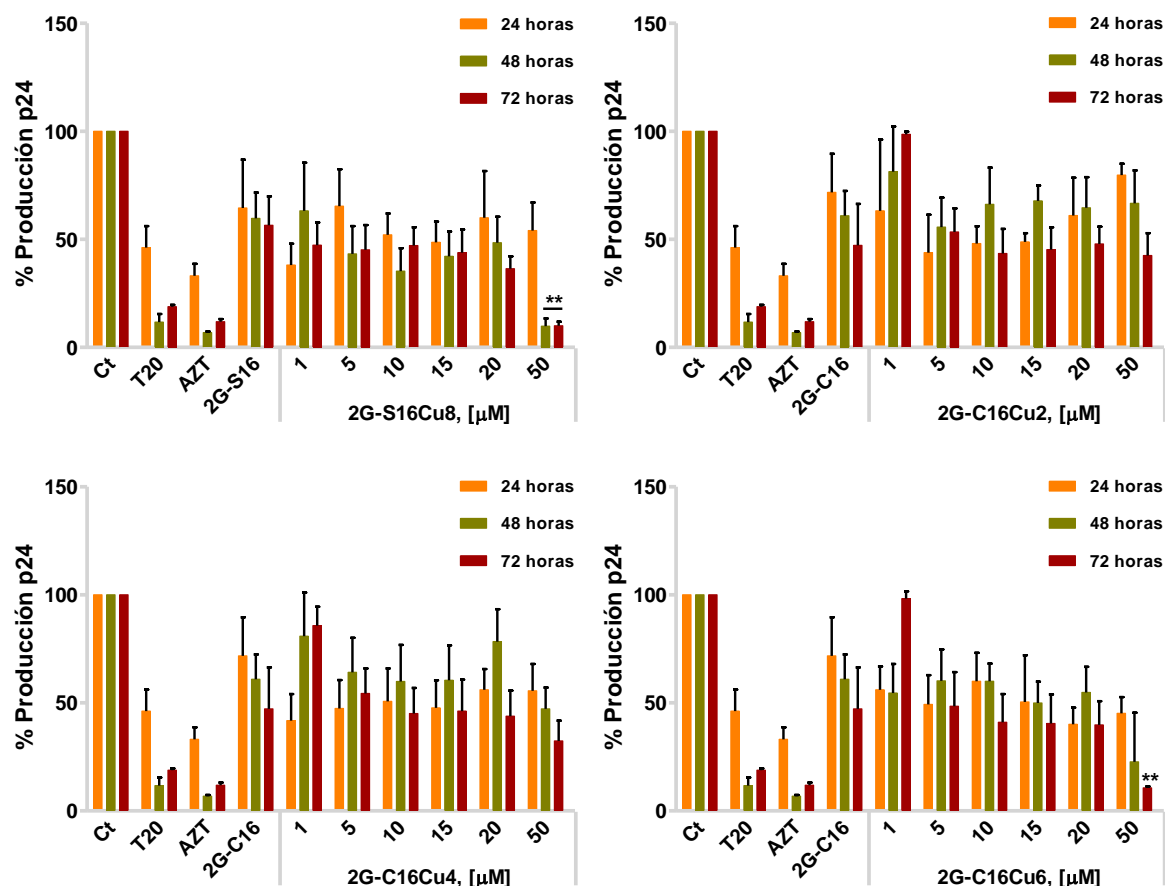
Al comparar con los dendrimeros controles 2G-C16 y 2G-S16, se observó un mayor efecto inhibidor en los métalo-dendrimeros, principalmente a las 24 horas. Estos resultados indican que la presencia de cobre en la periferia de ambos dendrimeros mejora sus propiedades antivirales. Sin embargo, no se observó una mayor capacidad inhibitoria por parte de los métalo-dendrimeros a mayores concentraciones de la utilizada en el caso de los dendrimeros control (2G-S16 y 2G-C16).



**Figura 38. Pre-tratamiento e infección de CMSP con el aislado viral X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub>.** Las CMSP fueron tratadas en primer lugar con los metaló-dendrimeros a distintos tiempos (0,5, 1 ó 2 horas). A continuación se llevo a cabo la infección de las células a una concentración de 10 ng/1x10<sup>6</sup> células. Tras 2 horas en contacto con el virus, se lavaron las CMSP. Tras 24 horas, se recogió el sobrenadante del cultivo y se cuantificó el antígeno p24<sup>gag</sup> por ELISA. NL4.3, aislado viral X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub> (control de células sin tratar); Dxt (Dextrano 15 μM). \*p-valor≤0,05; \*\*p-valor≤0,02; \*\*\*p-valor≤0,01 respecto al dendrimer control (2G-C16 ó 2G-S16).

## 4.4 Dendrimeros polifenólicos y de síntesis tiol-eno

Siguiendo con el desarrollo de un microbicida, en esta última parte de la Memoria se estudió la actividad anti-VIH de cuatro nuevos metaló-dendrimeros. Dos de ellos de núcleo polifenólico (2G-C24P y 2G-S24P), y otros dos desarrollados con un método nuevo de síntesis tiol-eno (2G-S32 y 2G-C32). Estos dendrimeros presentan en su periferia grupos carboxilato o sulfonato, como en el caso del 2G-C16 y el 2G-S16, por lo que estos dos últimos dendrimeros se utilizaron como control.



**Figura 39. Infección de CMSP con el aislado viral X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub>.** Se llevó a cabo la infección de las células a una concentración de 10 ng/1x10<sup>6</sup> células. Tras 2 horas en contacto con el virus, se lavaron las células. Posteriormente se llevó a cabo el tratamiento con los metalo-dendrimeros a las diferentes concentraciones. Tras 24, 48 y 72 horas se recogió el sobrenadante y el antígeno p24<sup>gag</sup> fue cuantificado por ELISA. Ct, control de células sin tratar; T-20 (20 μM) y Azt (1 μM) controles de inhibición. \*\*p-valor ≤ 0,02 respecto al dendrimer control (2G-C16 ó 2G-S16).

Estos dendrimeros 2G-S32 y 2G-C32 tienen la ventaja de ser más fáciles de sintetizar porque la reacción tiol-eno es más rápida, necesita condiciones de reacción más débiles, tiene mejores rendimientos, es compatible con más grupos funcionales y los pasos de purificación son más fáciles y cortos.<sup>265</sup> Estas características hacen de estos nuevos dendrimeros en comparación con los dendrimeros previamente desarrollados y estudiados en el laboratorio, mejores candidatos para su desarrollo como microbicida en el paso a la fase clínica.

Para un posible uso como microbicidas, se llevaron a cabo ensayos de toxicidad e inhibición del VIH-1 en las líneas celulares VK2/E6E7 y HEC-1A y en CMSP. También se

evaluó el efecto sobre la toxicidad en distintas líneas celulares de laboratorio como HeLa y TZM.bl.

#### 4.4.1 Estudio de biocompatibilidad

En todos los tipos celulares se analizó la toxicidad de los cuatro dendrímeros utilizando el ensayo MTS en un rango de concentración de 0,1-1000  $\mu\text{M}$  a 24 horas (Figura 40).

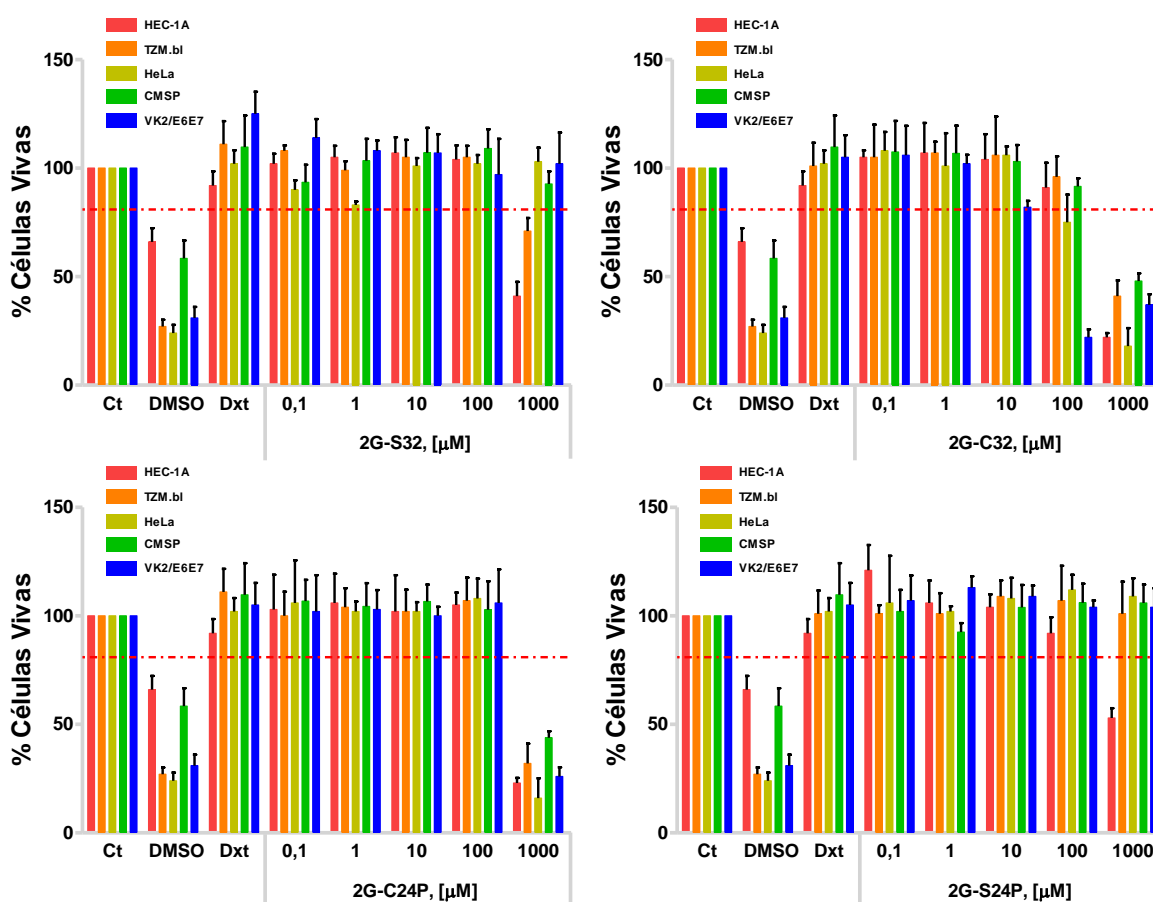


Figura 40. Viabilidad a 24 horas medida por el ensayo MTS en CMSP y las líneas celulares HEC-1A, VK2/E6E7, TZM.bl y HeLa. Las células fueron tratadas a distintas concentraciones de dendrímero para analizar el efecto de estos sobre la viabilidad celular utilizando el ensayo MTS. La viabilidad se cuantificó a 24 horas. Las concentraciones utilizadas de los dendrímeros fueron 0,1, 1, 10, 100 y 1000  $\mu\text{M}$ . Ct, control de células sin tratar; DMSO (10%) control positivo de muerte celular; Dxt (Dextrano 10  $\mu\text{M}$ ), control negativo de muerte celular.

Los resultados muestran que los dendrímeros 2G-S32, 2G-C24P y 2G-S24P no presentaron efectos tóxicos hasta la concentración de 100  $\mu\text{M}$  en CMSP y líneas celulares

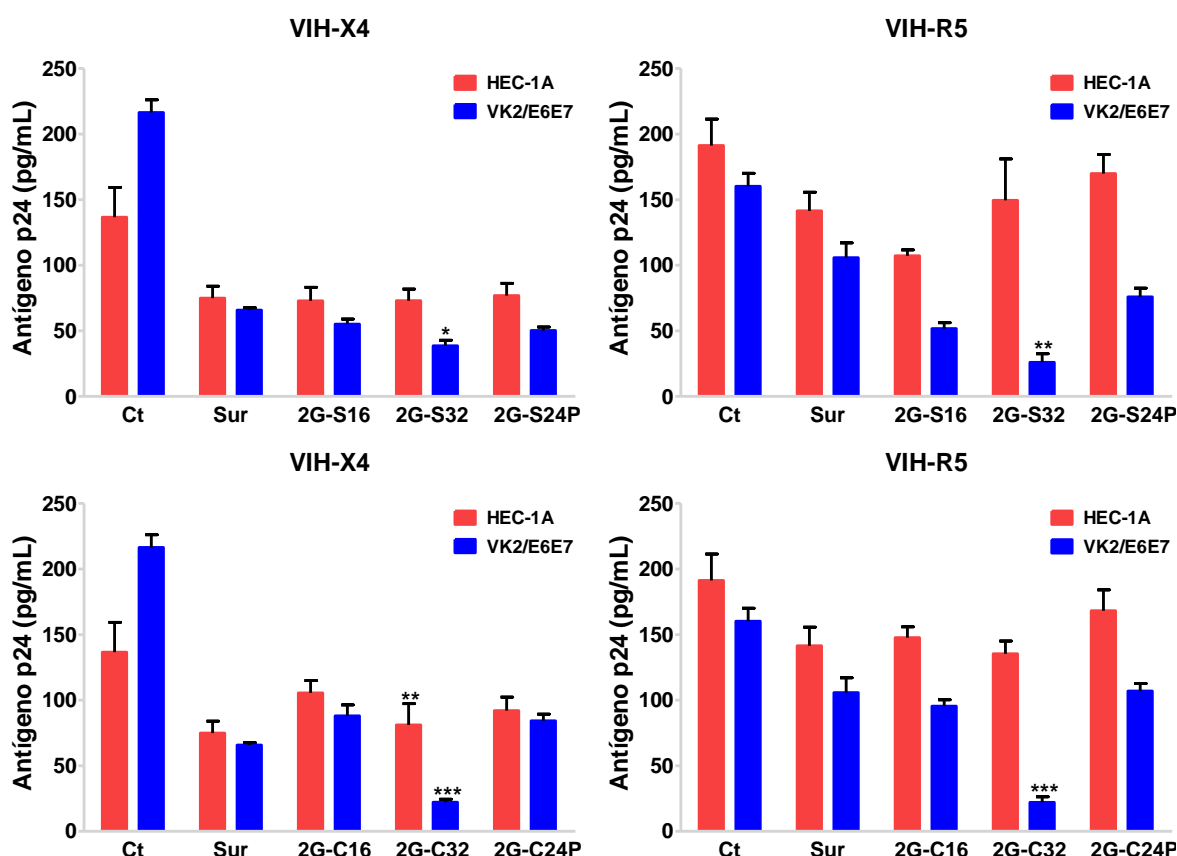
analizadas. Sin embargo, el dendrímero 2G-C32 a 100  $\mu$ M fue tóxico en las líneas celulares TZM.bl y VK2/E6E7. Debido a que para el 2G-C32 la concentración de 100  $\mu$ M fue tóxica en la línea de epitelio vaginal VK2/E6E7 y la mayoría de los dendrímeros a esta misma concentración produjeron daños en las paredes del epitelio vaginal en el estudio llevado a cabo en ratonas CD-1a (**Tabla 6**), se seleccionó la concentración de 10  $\mu$ M para los estudios de actividad antiviral frente al VIH-1.

#### 4.4.2 Ensayos de inhibición del VIH-1

En primer lugar, se pre-trataron las líneas celulares HEC-1A y VK2/E6E7 con los distintos dendrímeros durante 1 hora. Posteriormente, se infectaron con los aislados virales X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub> y R5 VIH-1<sub>AD8</sub> con el objetivo de conocer la especificidad de los dendrímeros por los correceptores CXCR4 o CCR5. Se recogió el sobrenadante de los cultivos celulares a las 24 horas y se cuantificó la producción de antígeno p24<sup>gag</sup> por ELISA (**Figura 41**).

Se observó un efecto inhibitorio de la producción de antígeno p24<sup>gag</sup> en todos los dendrímeros estudiados en las líneas celulares HEC-1A y VK2/E6E7, siendo estadísticamente significativo cuando se utilizaron los dendrímeros 2G-S32 y 2G-C32 en la línea VK2/E6E7 comparados con sus dendrímeros control (2G-S16 y 2G-C16, respectivamente), siendo de un 82% con el dendrímero 2G-S32 y de un 90% con el 2G-C32. También se observó una disminución de la infección por el VIH-1 del 47% y 41% en la línea HEC-1A con los dendrímeros 2G-S32 y 2G-C32, respectivamente, aunque en este caso fue similar a la encontrada cuando se compararon con los dendrímeros control (47% para el 2G-S16 y 23% para el 2G-C16). No se observaron diferencias significativas en los datos obtenidos cuando se compararon los efectos de los nuevos dendrímeros según se infectaran las células con aislados virales X4-trópico o R5-trópico (**Figura 41**).

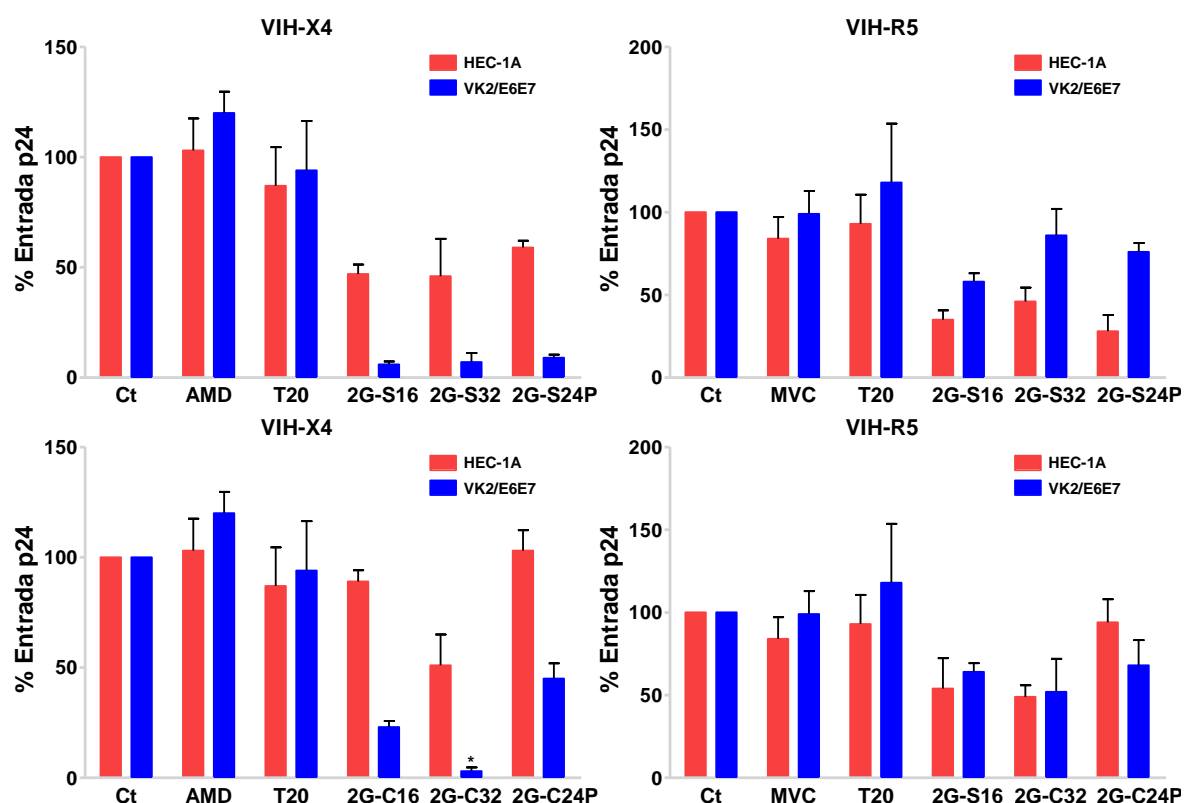
Sin embargo, se observó un efecto inhibidor mayor cuando se pre-trataron las células HEC-1A, con el dendrímero 2G-S32 y se infectaron con el aislado viral X4-trópico (47% de inhibición) en comparación con los resultados obtenidos tras la infección con un aislado R5-trópico (22% de inhibición) (**Figura 41**). En el caso de los dendrímeros con núcleo polifenólico 2G-C24P y 2G-S24P, en ambas líneas epiteliales, no se observaron diferencias cuando se compararon sus resultados con los obtenidos con sus respectivos dendrímeros control (2G-C16 y 2G-S16, respectivamente).



**Figura 41. Pre-tratamiento de las líneas HEC-1A y VK2/E6E7 con aislados virales X4 y R5.** Las células se trataron en primer lugar con los dendrímeros durante 1 hora a una concentración de 10  $\mu$ M. A continuación se llevó a cabo la infección de las células con los aislados virales X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub> y R5 VIH-1<sub>AD8</sub> a una concentración de 100 ng/1x10<sup>6</sup> células. Tras 2 horas en contacto con el virus, se lavaron las células. Tras 24 horas, se recogió sobrenadante y el antígeno p24<sup>gag</sup> fue cuantificado por ELISA. Ct, control de células sin tratar; Sur (Suramin, 10  $\mu$ M), control de inhibición. \*p-valor $\leq$ 0,05; \*\*p-valor $\leq$ 0,02; \*\*\*p-valor  $\leq$ 0,01 respecto al dendrímero control (2G-C16 ó 2G-S16).

A continuación se estudió el efecto de los dendrímeros sobre la entrada del VIH-1 en las células. Se pre-trataron las células HEC-1A y VK2/E6E7 con los cuatro dendrímeros 2G-C32, 2G-S32, 2G-C24P y 2G-S24P durante 1 hora. Tras ese tiempo se llevó a cabo la infección de las células con los aislados virales X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub> y R5 VIH-1<sub>AD8</sub> durante 2 horas, tiempo tras el cual se lavaron las células con PBS estéril y se lisaron las células con Tritón<sup>TM</sup> X-100 al 0,2% durante 40 minutos a 4°C. Finalmente, se cuantificó la producción de antígeno p24<sup>gag</sup> del lisado celular por ELISA. Los resultados (**Figura 42**) mostraron un efecto inhibitorio de la entrada viral para todos los dendrímeros, pero solo en el caso del dendrímero 2G-C32 para el aislado viral X4 la inhibición de la entrada fue estadísticamente significativa en comparación con su dendrímero control, el 2G-C16. Para el resto de

dendrimeros con ninguno de los aislados virales, así como en ambas líneas celulares se observaron mayores tasas de inhibición de la entrada viral cuando se compararon con sus correspondientes dendrimeros control (Figura 42).

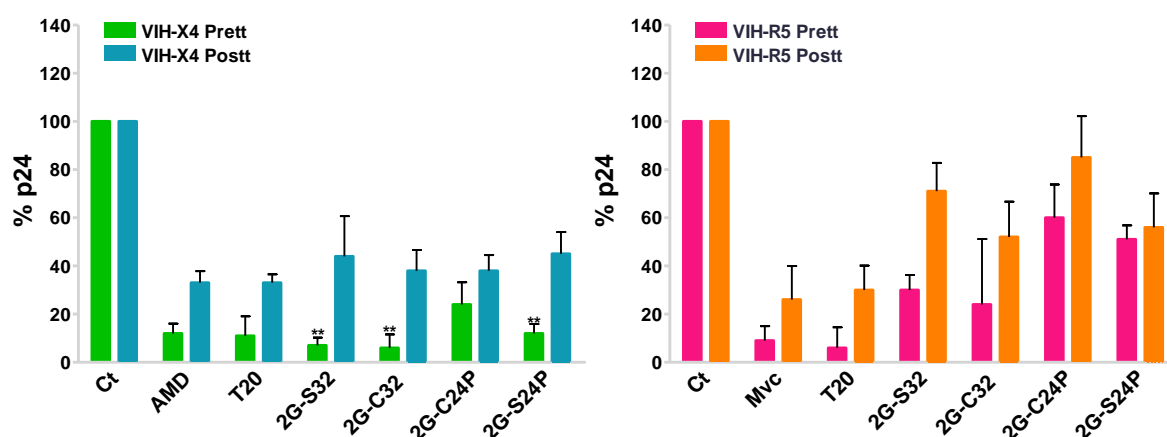


**Figura 42. Internalización del VIH en las líneas HEC-1A y VK2/E6E7.** Las células fueron tratadas con los dendrimeros a la concentración de 10  $\mu$ M para analizar el efecto de estos sobre la entrada viral. Tras 1 hora, se pusieron en contacto las células con los aislados virales X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub> y R5 VIH-1<sub>AD8</sub>. Tras 2 horas se recogieron las células y se lisaron para cuantificar por ELISA la cantidad de antígeno p24<sup>gag</sup> que se internalizó en las células. Ct, control de células sin tratar; el AMD (AMD3100, 100  $\mu$ M) y Mvc (Maraviroc, 10  $\mu$ M) antagonistas de los correceptores CXCR4 y del CCR5 respectivamente; T-20 (20  $\mu$ M), control de inhibición. \*\*p-valor  $\leq$  0,02 respecto al control (Ct). \*p-valor  $\leq$  0,05 respecto al dendrimeros control.

Finalmente, con el objetivo de conocer el posible efecto preventivo y terapéutico de cada uno de los cuatro dendrimeros se llevaron a cabo experimentos en CMSP. Para ello, las CMSP se pre-trataron con los diferentes dendrimeros 1 hora y posteriormente se infectaron con los aislados virales X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub> y R5 VIH-1<sub>AD8</sub> durante 1 hora (pre-tratamiento, prevención) o primero se infectaron con los aislados virales VIH-1<sub>NL4.3</sub> y VIH-1<sub>AD8</sub> durante 2 horas y posteriormente se trataron con cada uno de los 4 dendrimeros (post-tratamiento, terapia). Tras cada una de las infecciones, las CMSP se lavaron con PBS estéril para eliminar



las partículas de VIH-1 que no hubieran entrado en las células y se mantuvieron en cultivo durante 72 horas. Tras ese tiempo se recogió el sobrenadante y la producción de antígeno p24<sup>gag</sup> se cuantificó por ELISA. Los resultados mostraron que los cuatro dendrímeros presentaban actividad anti-VIH tanto para el pre-tratamiento como para el post-tratamiento de las CMSP con ambos aislados virales (**Figura 43**). En el caso del aislado viral X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub>, cuando se llevó a cabo el pre-tratamiento, los dendrímeros mostraron una inhibición estadísticamente significativa (salvo el caso del 2G-C24P). Para el resto de tratamientos y de aislado virales, aunque no fue estadísticamente significativa, se observó una clara tendencia de la inhibición tanto para el pre-tratamiento, como una vez que el virus ya se encuentra integrado en el interior celular (post-tratamiento).

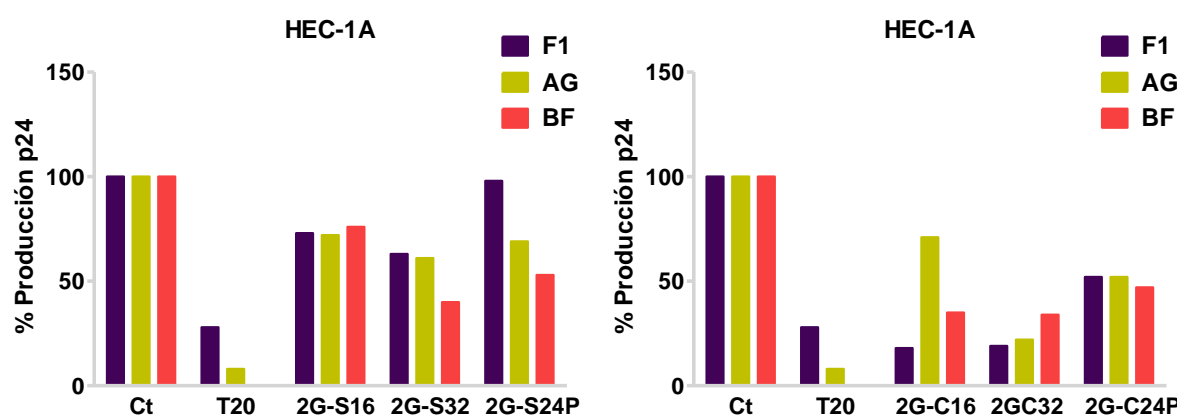


**Figura 43. Infección de CMSP con aislados virales X4 y R5 trópicos.** Las células fueron tratadas antes (Prett) o después (Postt) con los compuestos durante 1 hora. La infección de las células se llevó a cabo con los aislados virales X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub> y R5 VIH-1<sub>AD8</sub> a una concentración de 10 ng/1x10<sup>6</sup> células. Tras 2 horas en contacto con el virus, se lavaron las células. Tras 72 horas, se recogió sobrenadante y el antígeno p24<sup>gag</sup> fue cuantificado por ELISA. Ct, control de células sin tratar; T-20 (20 µM), control de inhibición; el AMD (AMD3100, 100 µM) y Mvc (Maraviroc, 10 µM) antagonistas de los correceptores CXCR4 y del CCR5 respectivamente. \*\*p-valor ≤ 0,02 respecto al control (Ct).

#### 4.4.3 Ensayos de inhibición del VIH aislado de individuos VIH+

Para probar que los dendrímeros carbosilano aniónicos eran capaces de inhibir la infección de otros aislados virales que no fueran aislados de laboratorio, se realizó un ensayo en HEC-1A con tres aislados virales procedentes de pacientes VIH+. Para ello, se llevó a cabo el pre-tratamiento durante 1 hora de las HEC-1A con los dendrímeros a la concentración de 10 µM. Posteriormente se infectaron con los aislados virales R5 VIH-1<sub>ES X-</sub>.

3016-2 (F1), R5 VIH-1<sub>ES</sub> P-2392-3 (CRF02\_AG) y R5 VIH-1<sub>ES</sub> X-2457-2 (BF). Se recogió el sobrenadante de los cultivos celulares a las 24 horas y se cuantificó la producción de antígeno p24<sup>gag</sup> por ELISA. Los resultados (Figura 44) mostraron la inhibición de la transmisión viral para los tres tipos de aislados primarios, siendo en el caso de los dendrímeros con grupos sulfonato en la periferia menor en comparación con los dendrímeros con grupos carboxilato en la periferia. Para el 2G-S32 y 2G-S24P la inhibición fue del 37%, 39% y 60% (2G-S32) y del 2%, 31% y 47% (2G-S24P) para los aislados F1, AG y BF, respectivamente. En el caso del 2G-S16 (dendrímero control para ambos) la inhibición fue del 27%, 28% y 24%, respectivamente. Para el 2G-C32 y 2G-C24P la inhibición fue del 81%, 78% y 66% (2G-C32) y del 48%, 48% y 53% (2G-C24P) para los aislados F1, AG y BF respectivamente, mientras que para su dendrímero control, el 2G-C16 fue del 82%, 29% y 65%, respectivamente (Figura 44).

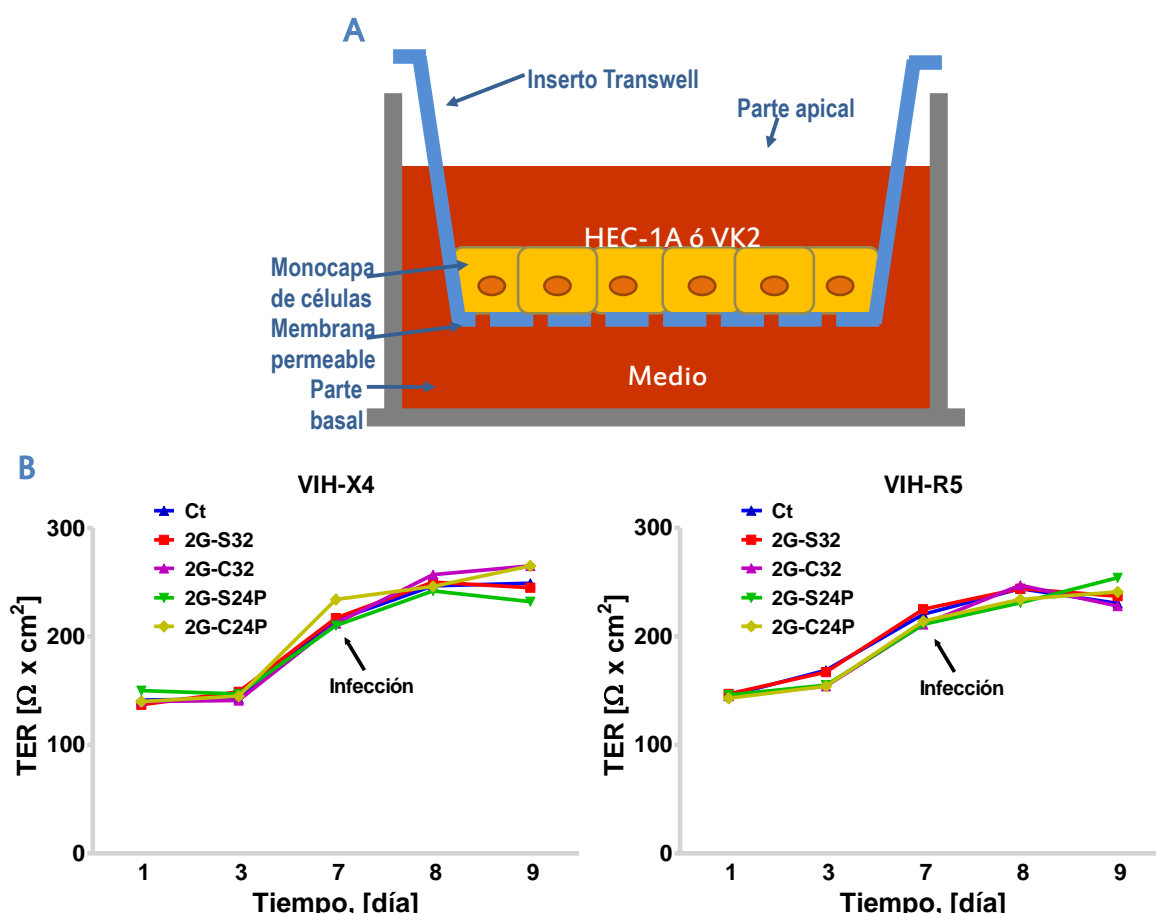


**Figura 44. Infección de HEC-1A con aislados virales R5-trópicos de individuos VIH+.** Las células se trataron en primer lugar con los dendrímeros durante 1 hora a una concentración de 10  $\mu$ M. A continuación se llevó a cabo la infección de las células con los aislados virales de pacientes R5 VIH-1<sub>ES</sub> X-3016-2 (F1), R5 VIH-1<sub>ES</sub> P-2392-3 (CRF02\_AG) y R5 VIH-1<sub>ES</sub> X-2457-2 (BF) a una concentración de 100 ng/1x10<sup>6</sup> células. Tras 2 horas en contacto con el virus, se lavaron las células con PBS estéril. Tras 72 horas, se recogió sobrenadante y el antígeno p24<sup>gag</sup> fue cuantificado por ELISA. Ct, control de células sin tratar; T20, control de inhibición.

#### 4.4.4 Inhibición de la transmisión viral a través de monocapa

Se ha descrito el uso de soportes permeables transwell para el estudio de futuros candidatos para su uso como microbicidas (Figura 45A).<sup>104,248</sup> En esta Memoria, se ha utilizado este tipo de soporte para comprobar si el tratamiento con los dendrímeros de las células epiteliales del aparato genital femenino, previenen el paso del virus a través de una

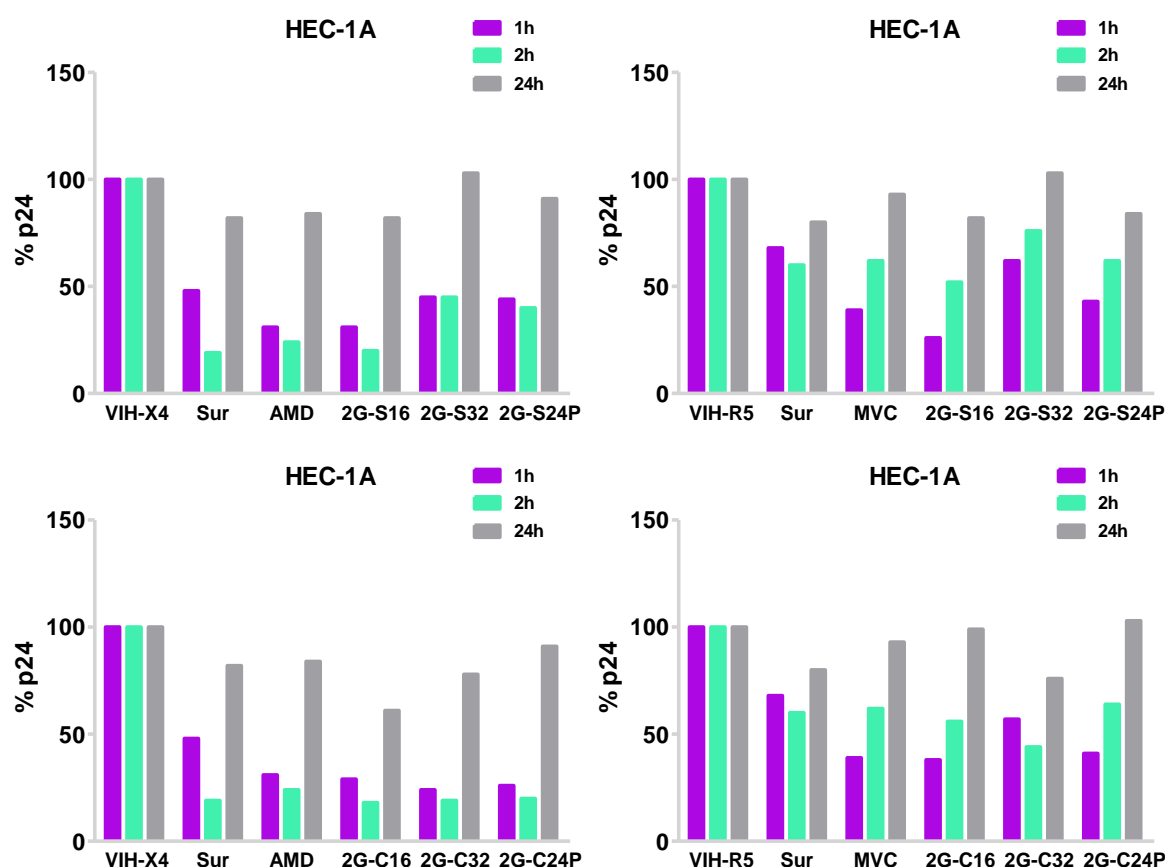
monocapa de células epiteliales. Para ello se procedió al cultivo de las líneas celulares de útero y vagina humanas (HEC-1A y VK2/E6E7) en el dispositivo transwell. Se procedió al cultivo de las células y para obtener una monocapa de células epiteliales polarizadas perfecta, las células se cultivaron durante 7 días (Figura 45A).<sup>104,248</sup>



**Figura 45. Resistencia eléctrica transepitelial (TER) medida a través de monocapa de HEC-1A. A |** Dibujo representativo del dispositivo transwell donde en cada depósito se sembraron  $2 \times 10^5$  células epiteliales. **B |** Valores de TER hasta 9 días después de iniciar el experimento con los dendrímeros.

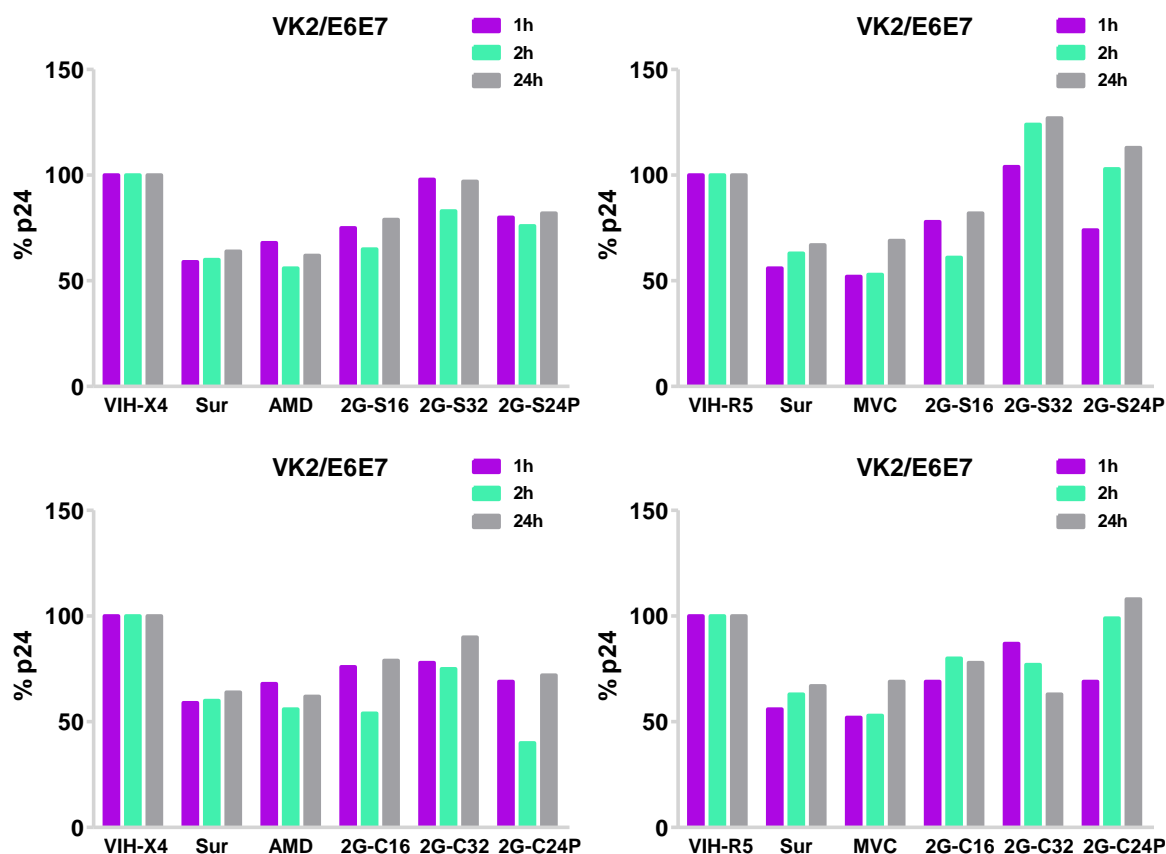
El establecimiento *in vitro* de estas propiedades de barrera se pueden estudiar monitorizando la resistencia eléctrica transepitelial (TER). Para ello, se colocan dos electrodos, uno fuera y otro dentro del inserto transwell. De esta forma, una reducción en el valor de TER indica una mala formación de la monocapa. Se utilizaron las líneas celulares HEC-1A y VK2/E6E7 para los experimentos de transmisión viral, aunque sólo las HEC-1A mostraron unos valores de resistencia no despreciables. Esto se debe a que las VK2/E6E7 presentan una escasa tendencia a la formación de uniones intercelulares estrechas como ha sido previamente descrito.<sup>253-254,266</sup> De esta manera, para el seguimiento de la correcta formación de la monocapa de VK2/E6E7, se cultivaron en paralelo el mismo número de células en una placa de 48 pocillos, debido a que el diámetro de este tipo de pocillos es

similar al del dispositivo transwell, pudiendo seguir mediante microscopia óptica la correcta formación de la monocapa. Se observó que los dendrímeros no afectaban a los valores de TER de la monocapa de HEC-1A. Es decir, que en el transcurso del día 7 y 9, que es cuando los dendrímeros estuvieron en contacto con las células y se recogió sobrenadante, la monocapa no sufrió ninguna alteración (**Figura 45B**). Se llevó a cabo el pre-tratamiento de las líneas celulares HEC-1A y VK2/E6E7 con los distintos dendrímeros durante 1 hora. Posteriormente, se infectaron con los aislados virales X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub> y R5 VIH-1<sub>AD8</sub>. Los resultados muestran que el pre-tratamiento de la monocapa de HEC-1A y VK2/E6E7 con los dendrímeros, redujo la presencia de partículas virales en el sobrenadante basolateral. En el caso de las HEC-1A, los valores disminuyeron en más de un 50% para las dos familias de dendrímeros tanto con virus X4 como con R5 en las 2 primeras horas de exposición al virus (**Figura 46**).



**Figura 46. Reducción de la transmisión viral a través de la monocapa de HEC-1A.** Las células se pre-trataron con los dendrímeros durante 1 hora a la concentración de 10  $\mu$ M. Posteriormente se trataron las células con los aislados virales X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub> ó R5 VIH-1<sub>AD8</sub> a la concentración de 100 ng/1x10<sup>6</sup> células, en la cámara superior del dispositivo transwell. Se recogió sobrenadante de la cámara inferior a 1, 2 y 24 horas y el antígeno p24<sup>gag</sup> fue cuantificado por ELISA. VIH-X4 y VIH-R5, células sin tratar; Sur (Suramin 10  $\mu$ M), control de inhibición; AMD (AMD3100 100  $\mu$ M) y MVC (Maraviroc 10  $\mu$ M), antagonistas de los correceptores CXCR4 y del CCR5 respectivamente.

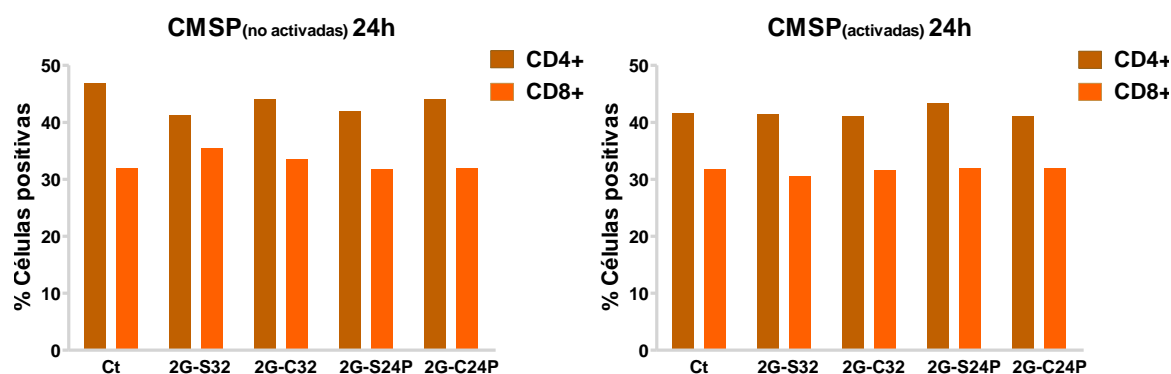
Mientras que en las VK2/E6E7 la disminución no fue mayor del 50%, aunque se observaba una tendencia a la disminución del paso del virus a través de la monocapa epitelial (Figura 47).



**Figura 47. Reducción de la transmisión viral a través de la monocapa de VK2/E6E7.** Las células se pre-trataron con los dendrímeros durante 1 hora a la dosis de 10  $\mu$ M antes de llevarse a cabo la infección de las células a la concentración de 100 ng/1x10<sup>6</sup> células con los aislados virales X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub> ó R5 VIH-1<sub>AD8</sub> en la cámara superior del dispositivo transwell. Se recogió sobrenadante de la cámara inferior a 1, 2 y 24 horas y el antígeno p24<sup>gag</sup> fue cuantificado por ELISA. VIH-X4 y VIH-R5, células sin tratar; Sur (Suramin 10  $\mu$ M), control de inhibición; AMD (AMD3100 100  $\mu$ M) y MVC (Maraviroc 10  $\mu$ M), antagonistas de los correceptores CXCR4 y del CCR5 respectivamente.

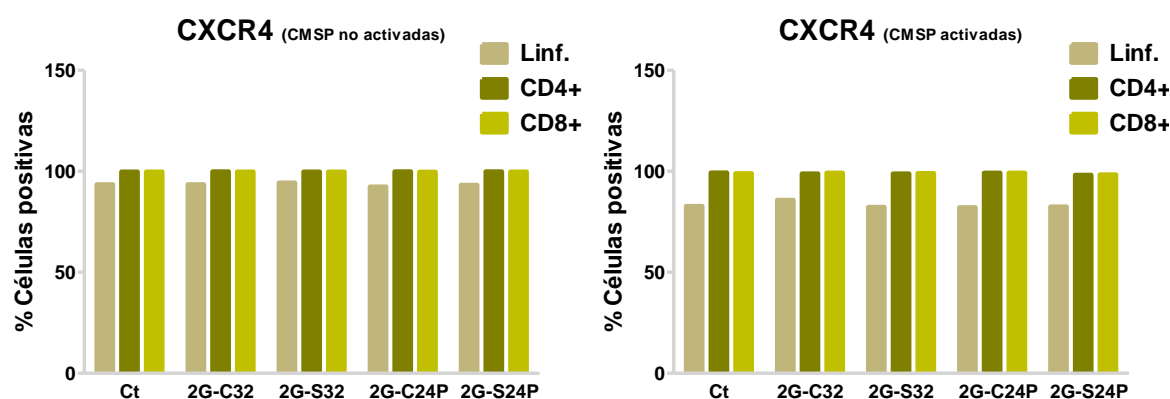
#### 4.4.5 Estudio de los receptores y correceptores celulares en CMSP

Se llevó a cabo el estudio de los receptores celulares en CMSP en estado basal y en CMSP estimuladas previamente durante 24 horas con PHA. Los resultados sobre los receptores celulares CD4 y CD8 mostraron que en ningún caso se veían alterados por la presencia de los dendrímeros 2G-C32, 2G-S32, 2G-C24P y 2G-S24P en comparación con las células no tratadas, tanto para aquellas que se encontraban en estado basal, como para aquellas que habían sido activadas con PHA (Figura 48).



**Figura 48. Efecto de los dendrímeros 2G-S32, 2G-C32, 2G-S24P y 2G-C24P sobre los receptores celulares CD4 y CD8 en CMSP.** Se estudió el efecto que los dendrímeros a la concentración de 10  $\mu$ M pudieran tener sobre CMSP en estado basal ó activadas con PHA durante 24 horas. Para ello, se trataron las células con los dendrímeros a la concentración de 10  $\mu$ M durante 24 horas. A continuación, se marcaron las células durante 30 minutos con anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8 para los receptores celulares CD4 y CD8, y se cuantificó la cantidad de células positivas para cada uno de los receptores. Ct, control de células sin tratar.

En el caso de los correceptores celulares CXCR4 y CCR5, se llevó a cabo el estudio igual que en el caso anterior en CMSP en estado basal y en CMSP previamente activadas 24 horas con PHA (**Figura 49**). Se muestran los resultados correspondientes al correceptor CXCR4, ya que los resultados obtenidos por citometría de flujo para el correceptor CCR5 dieron valores cercanos al 0.

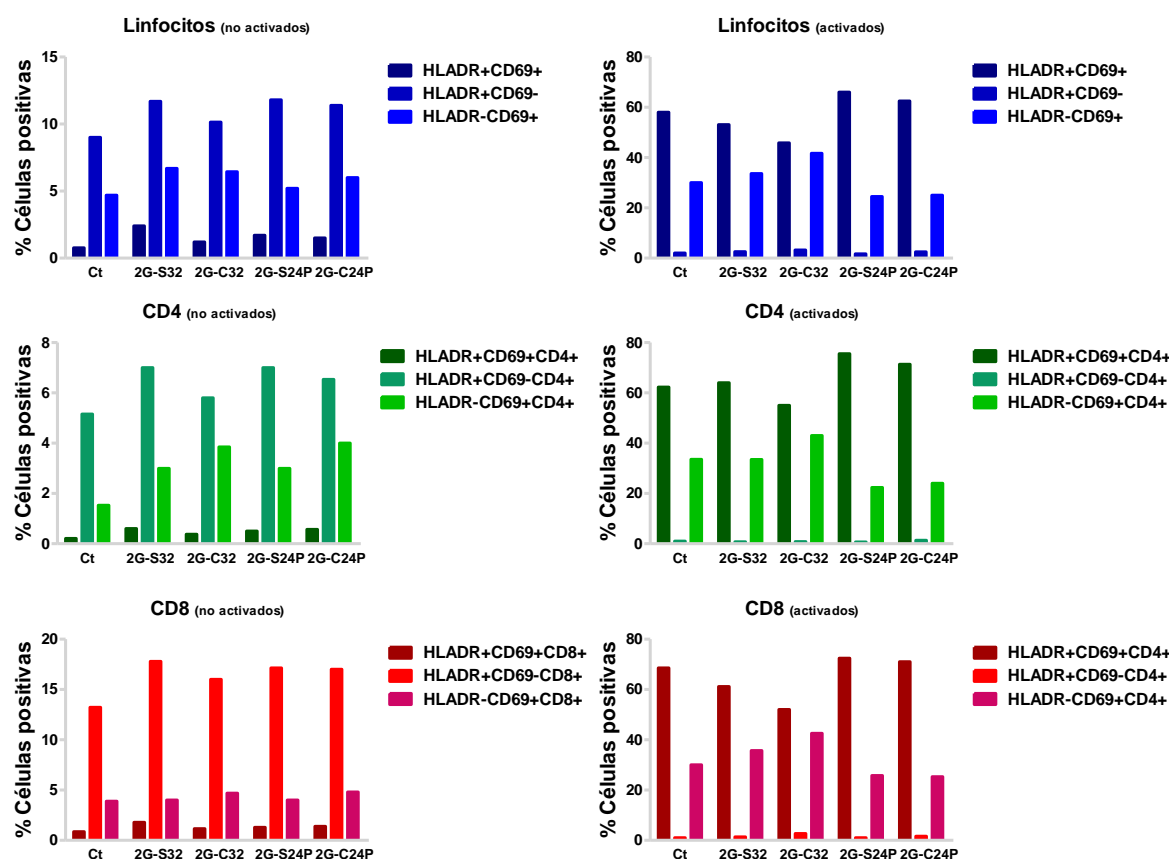


**Figura 49. Efecto de los dendrímeros 2G-C16 y 2G-S16 sobre el correceptor CXCR4 en CMSP.** Se estudió el efecto que los dendrímeros pudieran tener sobre CMSP en estado basal ó activado con PHA durante 24 horas. Para ello, se trataron las células con los dendrímeros a la concentración de 10  $\mu$ M. Tras 24 horas, se llevó a cabo el marcaje durante 30 minutos con anti-CXCR4 para el correceptor CXCR4 y se midió la cantidad de células positivas para el correceptor. Ct, control de células sin tratar.

El estudio realizado en tres poblaciones celulares presentes en CMSP (linfocitos totales, células T CD4+ y células T CD8+) no mostró diferencias entre las células tratadas con los dendrímeros 2G-C32, 2G-S32, 2G-C24P y 2G-S24P en comparación con las células sin tratar en estado basal y activadas previamente con PHA (Figura 49).

#### 4.4.6 Estudio de la activación celular en CMSP

Se llevó a cabo el estudio de activación celular mediada por los dendrímeros 2G-C32, 2G-S32, 2G-C24P y 2G-S24P a 24 horas en CMSP en estado basal y en CMSP activadas durante 24 horas con PHA (Figura 50).

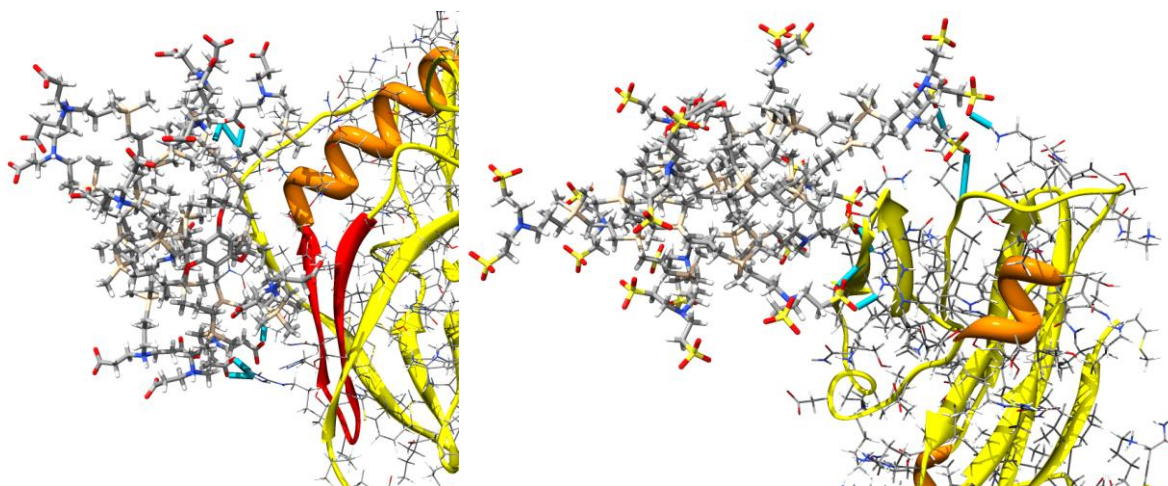


**Figura 50. Efecto de los dendrímeros 2G-S32, 2G-C32, 2G-S24P y 2G-C24P en la activación de CMSP.** Se estudió el efecto que los dendrímeros pudieran tener sobre la activación temprana y tardía de CMSP en estado basal ó activado con PHA durante 24 horas. Para ello, se trataron las células con los dendrímeros a la concentración de 10 µM durante 24 horas. Posteriormente se llevó a cabo el marcaje durante 30 minutos con anticuerpos anti-CD4, anti-CD8, anti-CD3, anti-CD69 y anti-HLADR y se analizó la cantidad de células positivas para el correceptor. Ct, control de células sin tratar.

Se observó que no se producían variaciones de la activación de las CMSP ni cuando se utilizaron marcadores de activación temprana (HLADR+) ni cuando se utilizaron marcadores de activación tardía (CD69+) en presencia de los dendrímeros, tanto en CMSP en estado basal como en CMSP activadas previamente 24 horas con PHA (**Figura 50**). Se obtuvieron los mismos resultados en las poblaciones estudiadas (linfocitos totales, células T CD4+ y células T CD8+) de CMSP sin activar o activadas con PHA (**Figura 50**).

#### 4.4.7 Ensayo de modelado computacional

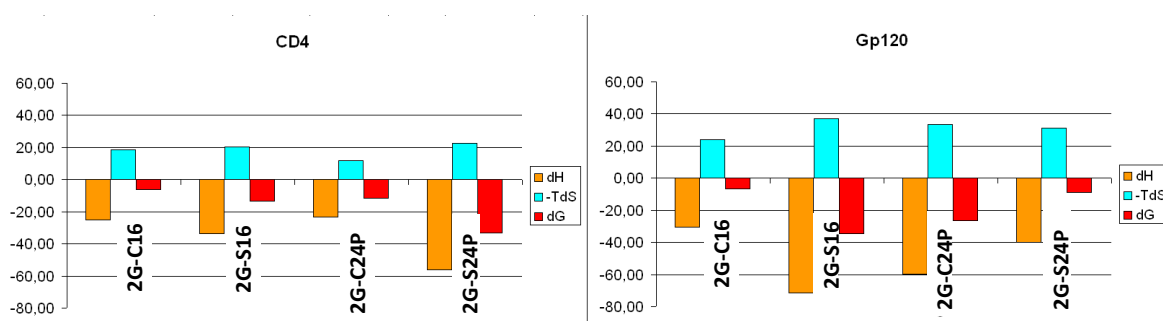
Como ya se ha descrito anteriormente en esta Memoria, la mayor parte de las interacciones entre los compuestos polianiónicos y el VIH-1, implican una atracción electrostática entre gp120 y grupos aniónicos de la periferia de los dendrímeros.<sup>256</sup> Cuando se llevaron a cabo los estudios de modelaje para el 2G-S16 y 2G-C16, también se llevaron a cabo para los dendrímeros carbosilano de núcleo polifenólico, debido a que en aquel momento ya se tenía su síntesis realizada (no era el caso de los dendrímeros carbosilano de síntesis tiol-eno). De la misma manera que en los dendrímeros anteriores, existe un área catiónica adecuada (principalmente debido a la presencia de 2 argininas) para la interacción favorable con los dendrímeros aniónicos 2G-S24P y 2G-C24P (**Figura 51**).



**Figura 51. Detalles de la unión de los complejos más estables cada caso (CD4, Gp120).** 2G-C24P/Gp120 (izquierda), 2G-S24P/CD4 (derecha). En rojo aparece coloreado el bucle V3 (área importante para la unión de los correceptores), en azul claro se muestran los puentes de hidrógeno y los enlaces de sal. La estructura visualizada es el resultado de 30 ns de simulaciones moleculares dinámicas en agua en presencia de iones Cl<sup>-</sup> y Na<sup>+</sup> (0,15 M).



En este caso como en el de los dendrímeros 2G-S16 y 2G-C16, se basó en su capacidad potencial para unirse a la glicoproteína gp120 del VIH-1 y/o al receptor CD4, y en particular a los sitios de unión para gp120/CD4. Para comprobar esta hipótesis, se llevaron a cabo en agua simulaciones atomizadas de dinámica molecular de los complejos de 2G-S24P/gp120 y 2G-S24P/CD4; 2G-C24P/gp120 y 2G-C24P/CD4. El segundo objetivo fue identificar el área de contacto gp120/CD4. En el ensayo computacional se pusieron ambos dendrímeros cerca de las áreas antes mencionadas y las consiguientes simulaciones moleculares dinámicas revelaron que el dendrímero 2G-S24P presentaba mayor especificidad por la unión a CD4, mientras que el 2G-C24P lo hacía con la gp120 (**Figura 52**).

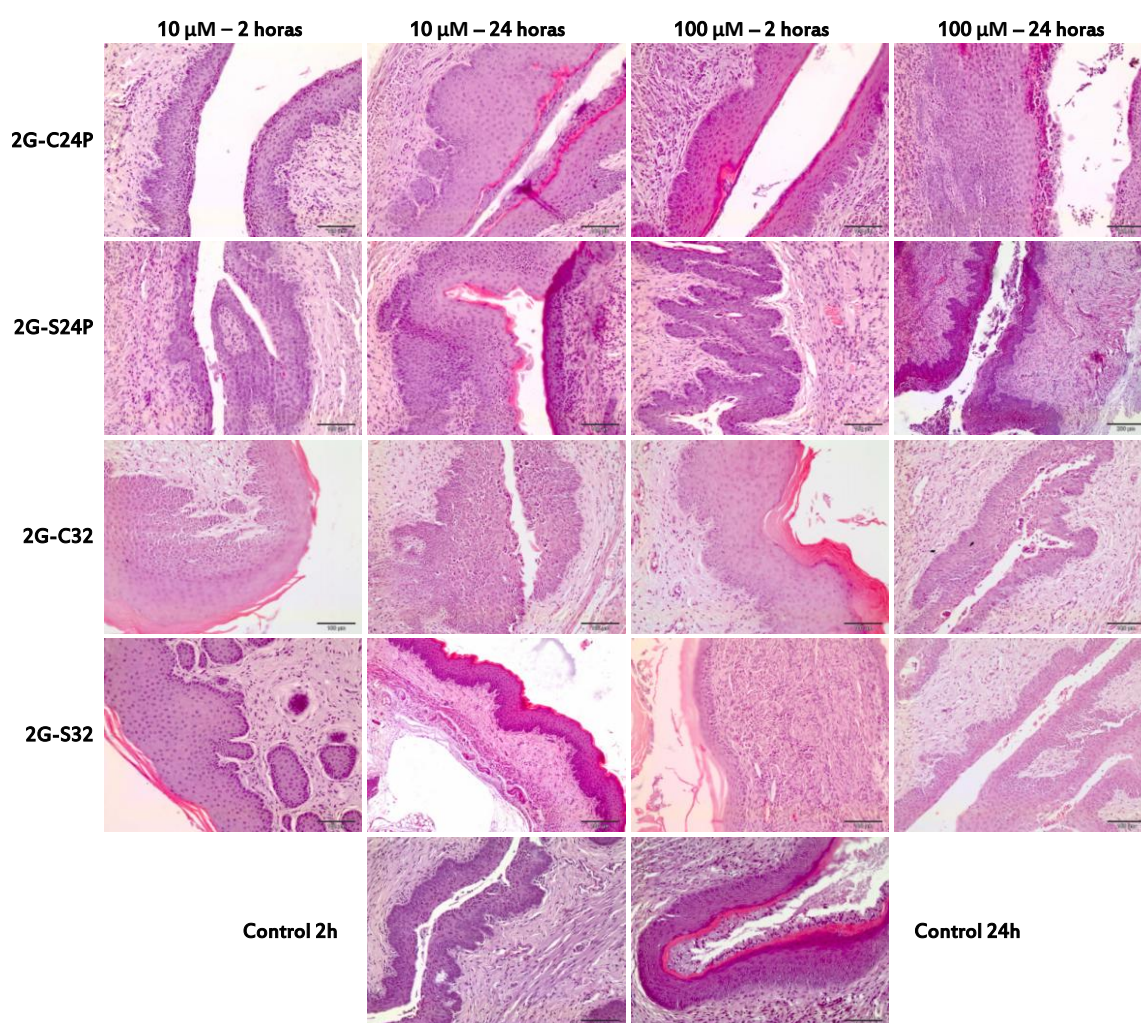


**Figura 52.** Los resultados de los análisis energéticos utilizando MM/método PBSA. Unión a CD4 (izquierda), y unión a gp120 (derecha).  $dG = dH - T\Delta S$ , donde la  $dG$  es la energía libre de unión (en rojo),  $dH$  es la entalpía (naranja) y  $T\Delta S$  la entropía (azul) ( $T$  es la temperatura y  $\Delta S$  es el cambio en la entropía debido a la unión). Los valores más negativos de la  $dG$  significa que hay una mejor unión (interacción más favorable).

#### 4.4.8 Evaluación de los dendrímeros en vaginas de ratonas CD-1a

Para valorar el efecto sobre el epitelio vaginal que los dendrímeros 2G-S32, 2G-C32, 2G-C24P y 2G-S24P pudieran producir se utilizaron ratonas CD-1a. En la mayoría de las muestras analizadas a las 2 horas de tratamiento no se observó ninguna lesión a lo largo del grosor del epitelio vaginal a la concentración de 10  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$  (**Figura 53 y tabla 6**). Tan sólo con el dendrímero 2G-S24P se observó una hiperplasia de grado mínimo del epitelio en una de las ratonas a la concentración de 100  $\mu\text{M}$  (**Figura 53 y tabla 6**). Esta hiperplasia se observó como un aumento en el grosor de la mucosa y la emisión de unas papilas que se extienden desde el epitelio a la submucosa, pero en ningún punto rompen la membrana basal que separa ambas capas. Sin embargo, a las 24 horas se observó hiperplasia en el epitelio de al menos una muestra de los animales tratados con todos los compuestos y a las

dos concentraciones (**Figura 53 y tabla 6**). Ésta fue moderada en un caso (2G-C24P a 100  $\mu$ M), leve en dos (2G-C24P y 2G-S24P a 100  $\mu$ M) y mínima en 4 casos (**Figura 53 y tabla 6**). El grupo 2G-C24P es el que presenta en todas sus muestras a 24 horas y a la concentración de 100  $\mu$ M un aumento en el grosor del epitelio y papilas hacia la submucosa (**Figura 53**). De nuevo, en ningún caso rompían la membrana basal. Como en los grupos tratados a las 2 horas, a las 24 horas no se observaron otras alteraciones en mucosa, submucosa o capa muscular de la pared de la vagina. Con el compuesto 2G-S32 a concentración de 10  $\mu$ M aparecía una hiperplasia moderada del epitelio que no se observó a las 24 horas. De nuevo no aparecían lesiones histológicas en el resto de las capas (**Figura 53**).



**Figura 53. Evaluación de los dendrímeros en vaginas de ratonas CD-1a.** Se estudió el efecto de los dendrímeros carboxilano aniónicos en la vagina de ratonas hembra CD-1a. Se utilizaron dos dosis de dendrímeros (10 y 100  $\mu$ M) a dos tiempos (2 y 24 horas).

	2G-S32 10µM 2h	2G-S32 100µM 2h	2G-S32 10µM 24h	2G-S32 100µM 24h	Vehículo
Lesión epitelial (0-4)	1,33 ± 1,53	0	0	0,33 ± 0,58	0
Infiltrado inflamatorio (0-4)	0	0,33 ± 0,58	0	0	0,33 ± 0,58
Congestión vascular (0-4)	0,33 ± 0,58	0	0,33 ± 0,58	0	0
Edema (0-4)	0	0	0	1 ± 1,73	0
Puntuación de irritación microscópica	1,7	0,3	0,3	1,3	0,3
Índice de irritación vaginal (0-16)	1,3	0,0	0,0	1,0	0

	2G-C32 10µM 2h	2G-C32 100µM 2h	2G-C32 10µM 24h	2G-C32 100µM 24h	Vehículo
Lesión epitelial (0-4)	1 ± 1	0,67 ± 1,15	1 ± 1,73	1,33 ± 0,58	0
Infiltrado inflamatorio (0-4)	0	0	0,33 ± 0,58	0	0,33 ± 0,58
Congestión vascular (0-4)	0	0	0	0	0
Edema (0-4)	0,33 ± 0,58	1,67 ± 1,15	1,33 ± 1,53	1,67 ± 1,15	0
Puntuación de irritación microscópica	1,3	2,3	2,7	3,0	0,3
Índice de irritación vaginal (0-16)	1,0	2,0	2,3	2,7	0

2 HORAS	2G-C24P 10µM 2h	2G-C24P 100µM 2h	2G-C24P 10µM 24h	2G-C24P 100µM 24h	Vehículo
Lesión epitelial (0-4)	0	0	0,33 ± 0,58	2 ± 1	0
Infiltrado inflamatorio (0-4)	0	0	0	0	0,33 ± 0,58
Congestión vascular (0-4)	0	0	0	0	0
Edema (0-4)	0	0	0	0	0
Puntuación de irritación microscópica	0	0	0,3	2,0	0,3
Índice de irritación vaginal (0-16)	0,0	0,0	0,0	1,7	0

24 HORAS	2G-S24P 10µM 2h	2G-S24P 100µM 2h	2G-S24P 10µM 24h	2G-S24P 100µM 24h	Vehículo
Lesión epitelial (0-4)	0	0,33 ± 0,58	0,33 ± 0,58	0,67 ± 1,15	0
Infiltrado inflamatorio (0-4)	0	0	0	0	0,33 ± 0,58
Congestión vascular (0-4)	0	0	0	0,33 ± 0,58	0
Edema (0-4)	0	0	0	0	0
Puntuación de irritación microscópica	0	0,33	0,3	1,00	0,3
Índice de irritación vaginal (0-16)	0,0	0,0	0,0	0,7	0

**Tabla 6. Valoración del daño tisular.** Valoración del infiltrado de células inflamatorias, la congestión vascular y el edema presentes en la submucosa y tejido muscular bajo el epitelio. Los valores asignados fueron 0: sin lesiones; 1 lesión mínima; 2: leve; 3: moderada; 4: intensa. De arriba abajo están representados los datos de los dendrímeros 2G-S32, 2G-C32, 2G-C24P y 2G-S24P respectivamente.

En las vaginas tratadas con los dendrímeros 2G-C24P, 2G-S24P y 2G-S32 se detectó un aumento del grosor del epitelio de la mucosa junto con la formación de papilas que invaden la submucosa. Estos efectos fueron mayoritariamente mínimos o leves y en ningún caso se produjo la ruptura de la membrana basal que separaba la mucosa de la submucosa y que no se acompañó de inflamación ni otros cambios en la mucosa vaginal. En las vaginas tratadas con el dendrímero 2G-C32 se observó la presencia de edema de grado 1 (mínimo) en la submucosa (**Figura 53 y tabla 6**) este efecto parecía estar relacionado con la concentración, porque fue más frecuente en las ratonas tratadas con la concentración de dendrímero de 100 µM que en las de 10 µM. Así, con la concentración de 100 µM todas las muestras tanto a las 2 horas como a las 24 presentaron edema con aumento del grosor de la submucosa con una severidad similar: moderada en 1 muestra y mínima en otras 2. A la concentración de 10 µM se encontró en una muestra a 2 horas y en 2 muestras a 24 horas, siendo moderada en

una muestra de este último tiempo. También se observó una hiperplasia del epitelio de la mucosa que, en este caso, parecía estar más asociada al tiempo que a la concentración. Aunque apareció en dos muestras a las 2 horas con 10  $\mu$ M (**Figura 53**), la severidad y el número de animales afectados fue mayor a las 24 horas (**Figura 53**).

En conclusión en las vaginas tratadas a las concentraciones de 100  $\mu$ M durante 24 horas con los dendrímeros 2G-C24P y 2G-S24P se encontraron el mayor número de muestras con presencia de hiperplasia del epitelio de la mucosa. También a 24 horas y con la concentración de 10  $\mu$ M se encontró esta lesión, así como con el tratamiento con 2G-S32 a las 2 horas. El compuesto 2G-C32 parecía producir edema en la pared de la vagina que fue concentración dependiente y una hiperplasia del epitelio que aumentaba a las 24 horas. Este efecto podría estar relacionado con una ligera acción del dendrímero aplicado, sobre todo si hubiera actividad hormonal o de factor de crecimiento, aunque la intensidad de la lesión fue principalmente de tipo mínimo-leve.<sup>267</sup>

#### 4.4.9 Efecto del pH en la actividad de los dendrímeros

Debido al bajo pH presente en las vaginas humanas (menor de 4,5)<sup>29</sup> y a la baja solubilidad presentada por otros compuestos similares a pH ácidos,<sup>149</sup> se estudió si en presencia de pH ácidos, los dendrímeros perdían capacidad antiviral. Para ello, se llevó a cabo la infección de células TZM.bl con el aislado viral X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub> y se trataron con dendrímeros que habían sido incubados previamente durante 1 hora en PBS estéril con diferentes pH (3, 4 y 5,5), utilizándose como control un pH de 7, y un plasma seminal. Los resultados (**Tabla 7**) mostraron en todos los casos, que el pH ácido no afectó a la actividad anti-VIH de los dendrímeros, ya que los porcentajes de inhibición obtenidos se encontraban en torno al 100% a 24 y 48 horas.

% Infección	pH 7		pH 5,5		pH 4		pH 3		Plasma Seminal	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
Ct	100	100	100	100	100	100	100	100	—	—
2G-S16	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1
2G-S32	0	0	0	1	0	1	1	1	2	1
2G-S24P	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1

**Tabla 7. Efecto del pH en las características antivirales de los dendrímeros.** Valores en tanto por cien de las tasas de infección en TZM.bl pre-tratadas con los dendrímeros a la concentración de 10  $\mu$ M durante 1 hora. Antes de llevarse a cabo el pre-tratamiento, los dendrímeros fueron incubados durante 1 hora en PBS a distintos pH, utilizándose PBS con pH 7 y plasma seminal como control. Ct, células sin tratar.





## ***5. DISCUSIÓN***





## 5. DISCUSIÓN



En la prevención de la infección por el VIH no hay hasta la fecha una vacuna segura y efectiva y en los últimos años ha incrementado la investigación en terapias alternativas de prevención de la infección por el virus en mujeres y hombres, basada en la utilización de productos de aplicación tópica vía vaginal y/o rectal.<sup>29,269-271</sup> Debido a que cerca de la mitad de los individuos que viven con el VIH son mujeres que se han infectado mayoritariamente por vía sexual, la mayoría de microbicidas se han centrado en la mujer existiendo diferentes nanopartículas que interfieren en la transmisión del VIH a través del epitelio del tracto genital femenino.<sup>104,223,272-273</sup>

Se está investigando el papel de los dendrímeros como posibles microbicidas no-específicos frente al VIH y se han obtenidos resultados prometedores en ensayos clínicos con el dendrímero SPL7013 o VivaGel®.<sup>227-228</sup> Sin embargo, aunque se han estudiado varias moléculas polianiónicas como potenciales microbicidas y los resultados de eficacia y seguridad en las fases de ensayos preclínicos y clínicos han sido positivos, ninguna de ellas ha mostrado alta eficacia en humanos, no disponiéndose actualmente de ningún microbicida que prevenga la infección por el VIH.<sup>149,274</sup>

Los dendrímeros aniónicos de estructura cabosilano son nanomoléculas estables en solución. Estos dendrímeros presentan gran variedad de modificaciones a nivel de estructura química y a nivel de los grupos periféricos.<sup>104</sup> En el laboratorio se ha mostrado que el dendrímero carbosilano aniónico con 16 grupos sulfonatos en la periferia, 2G-S16, es altamente biocompatible, no induce activación celular y tiene actividad anti-VIH en células epiteliales y en células primarias humanas.<sup>104</sup> Sin embargo, se conocía muy poco sobre el efecto que podría tener como microbicida el dendrímero carbosilano con 16 grupos carboxilato en la periferia, 2G-C16. Por lo tanto, en primer lugar se estudió la bioseguridad de este dendrímero en diferentes tipos celulares y su capacidad de inhibir la transmisión e infección viral con el objetivo de conocer su potencial como microbicida.

Los dendrímeros 2G-S16 y 2G-C16 no fueron tóxicos a la concentración de 10  $\mu$ M en ninguna de las líneas o cultivos primarios celulares utilizados en esta Memoria. Además no alteraron los niveles de receptores celulares CD4 y CD8, ni de los correceptores CCR5 y CXCR4 en diferentes poblaciones celulares de sangre periférica.

El efecto antiviral de los dendrímeros 2G-S16 y 2G-C16 se estudió en primer lugar en las líneas epiteliales del tracto genital femenino HEC-1A y VK2/E6E7. Se pre-trataron las células con los dendrímeros 2G-S16 y 2G-C16 y posteriormente se infectaron con los aislados X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub> y R5 VIH-1<sub>AD8</sub>. Los dos dendrímeros tuvieron un efecto significativo de la inhibición de la infección por el VIH-1<sub>NL4.3</sub> y VIH-1<sub>AD8</sub> en la línea celular VK2/E6E7. Sin embargo, en la línea celular HEC-1A sólo se observó una disminución significativa de la infección por el X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub> y R5 VIH-1<sub>AD8</sub> cuando se utilizó el dendrímero 2G-S16. Un efecto similar se observó en los experimentos de internalización del VIH en las células. Cuando los dos tipos celulares se pre-trataron con los dendrímeros 2G-S16 y 2G-C16 se observó una disminución de la entrada de los aislados virales X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub> y R5 VIH-1<sub>AD8</sub>, pero sólo fue significativa cuando se pre-trataron las células VK2/E6E7 con el dendrímero 2G-S16. En resumen, aunque ambos dendrímeros podrían actuar como barrera física en la prevención de la transmisión del VIH-1 a través de las células vaginales y del endometrio, el que presentó un mejor perfil fue el dendrímero 2G-S16.

Sin embargo, cuando se utilizaron aislados virales R5 procedentes de individuos VIH+ (R5 VIH-1<sub>ES X-3016-2</sub> (F1), R5 VIH-1<sub>ES P-2392-3</sub> (CRF02\_AG) y R5 VIH-1<sub>ES X-2457-2</sub> (BF)) se observó un efecto inhibitor de la infección por el VIH con el pre-tratamiento de los dendrímeros, aunque menor que el observado con las cepas virales establecidas, y también se observaron diferencias a nivel de inhibición del VIH-1 entre los virus R5 procedentes de los individuos VIH+. En este sentido hay que tener en cuenta que los virus que utilizan el receptor CCR5 se transmiten y predominan preferentemente en las fases tempranas de la infección. Sin embargo, el 50% de los pacientes que progresan clínicamente mantienen virus R5. Estos virus R5 modifican sus propiedades biológicas e incrementan la progresión de la enfermedad en los individuos VIH+. En concordancia con ello, se ha observado que los virus R5 procedentes de individuos que han progresado clínica (estadíos tardíos de la infección; aislados R5 VIH-1 tardíos) tienen capacidad replicativa y efecto citopático mayor comparado con los virus R5 procedentes de individuos en el periodo de la seroconversión<sup>275-276</sup> y se correlacionan con caída de linfocitos T CD4+.<sup>277</sup> Además, se ha mostrado que los aislados R5 procedentes de pacientes en estadíos avanzados son más resistentes a la inhibición por quimiocinas-R5 que los aislados en la primoinfección o fase aguda de la infección<sup>278-279</sup> y podría ser debido a un incremento en la afinidad de la gp120 por los CD4 y/o el correceptor.<sup>280</sup> Estas propiedades correlacionan con cambios en las secuencias de las envueltas virales durante la infección que podrían modular varios pasos importantes en la entrada del virus a las células.<sup>280</sup> Estos datos indican que las envueltas de

los aislados virales R5 no son iguales entre si y que no funcionan con la misma intensidad. Esta podría ser una de las explicaciones del porqué la diferencia de resultados entre diferentes tipos de aislados virales. Así mismo, estos resultados indican que el estudio de las nanopartículas se debe llevar a cabo en distintos aislados virales procedentes de individuos VIH+ y preferentemente deberían ser en aislados procedentes de la primoinfección o fase aguda de la enfermedad. En resumen, aunque ambos dendrímeros podrían actuar como barrera física en la prevención de la transmisión del VIH-1 a través de las células vaginales y del endometrio, el que presentó un mejor perfil fue el dendrímero 2G-S16. Estos datos indicaban que el modo de acción de los dos dendrímeros debía ser diferente y por ello se diseñaron experimentos de modelaje molecular y de entrada viral.

Se estudió la interacción directa de los dendrímeros 2G-C16 y 2G-S16 con los aislados virales X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub> y R5 VIH-1<sub>AD8</sub> en CMSP, observándose una disminución de la capacidad infectiva de ambos aislados virales. Sin embargo, la mayor pérdida de infectividad se observó con el aislado X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub>. Aunque la mayoría de las infecciones por el VIH-1 se producen por la interacción del VIH-1 con tropismo R5 con el correceptor CCR5, en el diseño de una nueva estrategia antiviral no se debe ignorar el VIH-1 con tropismo X4.<sup>30</sup> Por otra parte, aunque el receptor principal del VIH-1 es el CD4, hay que tener en cuenta que existe un mecanismo de infección independiente de esta unión, el cual predomina en la infección por el VIH-2 y el VIS.<sup>3</sup> En los experimentos de inactivación viral en CMSP se observó que tras 1 hora de pre-tratamiento con los dendrímeros 2G-S16 y 2G-C16 a concentración de 10 µM se producía una disminución de más de un 90% de la infectividad de los aislados virales X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub> y R5 VIH-1<sub>AD8</sub>. Sin embargo, el mismo experimento utilizando la concentración de 1 µM de los dendrímeros 2G-S16 y 2G-C16 mostró que para conseguir un efecto significativo de disminución de infectividad se necesitaba una concentración diez veces mayor del dendrímero 2G-C16 en comparación con el 2G-S16. En resumen, debido a la inhibición significativa tanto de virus R5 como virus X4, ambos dendrímeros podrían ser candidatos a microbicidas,<sup>281</sup> aunque para obtener el mismo resultado se necesita una concentración mayor del dendrímero 2G-C16.

Los inhibidores aniónicos se consideran tradicionalmente inhibidores de la entrada del VIH-1. Su actividad anti-VIH está asociada con las interacciones electrostáticas entre la gp120 del VIH-1 y diferentes grupos funcionales de estos inhibidores que previenen la unión del virus a la célula diana.<sup>104,210,282</sup> Para conocer el posible mecanismo de inhibición de la entrada/internalización del VIH-1 en las líneas epiteliales y en las CMSP e hipotetizar

las diferencias de resultados obtenidas con cada uno de los dendrímeros, se llevaron a cabo estudios de modelaje computacional de los dos dendrímeros y sus posibles interacciones con la gp120 viral y el receptor CD4. Se observó que se formaban complejos estables con gp120 y CD4, uniéndose en zonas cruciales para la interacción de gp120 con el receptor CD4 o con los correceptores CXCR4 y CCR5. Los resultados indicaron que la interacción de las cargas aniónicas del dendrímero 2G-S16 con la gp120 eran más intensas cuando se utilizaron aislados virales X4 que cuando se utilizaron aislados virales R5, debido a la variación de los aminoácidos en la región V3 de la gp120. La región V3 determina si el virus se une al correceptor CCR5 e infecta preferentemente a macrófagos o se une al correceptor CXCR4 e infecta principalmente células T.<sup>283</sup> La interacción del dendrímero 2G-S16 con la V3 de la gp120 ha sido previamente descrita en otras nanomoléculas aniónicas con potencial microbicida.<sup>210</sup> Aunque el dendrímero 2G-C16 también se unía a la gp120 y al CD4, esta interacción era más débil debido probablemente al carácter “zwitteriónico” del dendrímero 2G-C16. El 2G-C16 es un dendrímero aniónico, pero esa característica le hace tener un carácter bipolar teniendo cargas formales positivas y negativas sobre átomos diferentes, y la interacción, aunque débil, se produce con la gp120 y con el receptor CD4.

En la misma línea de conocer el posible mecanismo de inhibición de la entrada/internalización del VIH y de hipotetizar los resultados obtenidos, se realizaron ensayos en los clones celulares CD4/R5 y CD4/X4 de la línea U87. Los resultados indicaron un mayor efecto inhibitor del dendrímero 2G-C16 cuando se realizaron experimentos de pre-tratamiento con aislados virales X4 o R5, en comparación con los resultados obtenidos con el dendrímero 2G-S16. Estos resultados se podrían deber al carácter bipolar y la débil interacción con la gp120 y el CD4 del dendrímero 2G-C16 en comparación con la mayor especificidad para unirse a gp120 que tiene el dendrímero 2G-S16, que hiciera que se viera afectada su unión a CD4 al entrar en contacto con las células. Es importante puntualizar, que los clones celulares U87 no son un sistema fisiológico, ya que en el organismo no se encuentra este tipo celular con tan altos porcentajes del receptor CD4 y de uno u otro correceptor CXCR4 o CCR5.<sup>284</sup>

Esta hipótesis estaría en consonancia con los datos obtenidos previamente en las líneas celulares epiteliales, donde la menor capacidad de inhibición del dendrímero 2G-C16 podría deberse a la ausencia de expresión de correceptor CCR5 de las células HEC-1A.<sup>281</sup> Es decir, el dendrímero 2G-C16 tendría mayor interacción con los correceptores celulares y al no expresarse tendría menor efecto, mientras que el dendrímero 2G-S16 se uniría a la

gp120 del virus y/o el receptor CD4 celular y tendría un mayor efecto inhibitorio. Aunque se ha descrito que la línea celular HEC-1A se infecta selectivamente por virus con tropismo X4 y no con virus con tropismo R5,<sup>57</sup> en los experimentos realizados se observó infección de las HEC-1A con el aislado viral R5 VIH-1<sub>AD8</sub>. Aunque no se ha estudiado el mecanismo de entrada de aislados virales en esta línea celular, los datos claramente indican que también se produce infección por R5 VIH-1 en la línea celular HEC-1A, que no expresa el correceptor CCR5. Además, está descrito que no todas las líneas del epitelio del tracto genital femenino integran el ADN proviral en su genoma, a pesar de secuestrar y liberar el virus al sobrenadante del cultivo.<sup>57</sup> Por tanto, es posible que el efecto antiviral sea más efectivo en una línea que presente un comportamiento distinto al de la línea celular HEC-1A, donde se integra el ADN proviral pero la producción de nuevas partículas infectivas es muy baja.<sup>57,281</sup>

Aunque hay varios ensayos clínicos en marcha con posibles microbicidas tópicos, solamente uno ha mostrado resultados positivos en humanos.<sup>153,262,270</sup> Algunos microbicidas tópicos producen un incremento de la infección por el VIH-1 asociada a daños e inducción de un foco local de inflamación en el epitelio vaginal, por ejemplo el sulfato de celulosa.<sup>218</sup> Por otra parte, los resultados del ensayo clínico en el que está indicada la aplicación de Vivagel® dos veces al día durante varias semanas han mostrado irritación vaginal tras la exposición repetida al gel.<sup>285</sup> La conclusión que se obtiene de los ensayos clínicos con diferentes nanopartículas es que solamente se deben utilizar las moléculas que no produzcan daño vaginal y rectal para prevenir la transmisión del VIH. Los resultados obtenidos en esta Memoria muestran que el tratamiento de células epiteliales con los dendrímeros aniónicos 2G-S16 y 2G-C16 no inducen proliferación celular, no alteran la activación celular temprana o tardía, no producen alteración de la flora vaginal, no producen lesiones en la vagina en ratonas CD-1a, el pH ácido no afecta a las funciones anti-VIH de los dendrímeros y al entrar los dendrímeros en contacto con los espermatozoides no alteran el índice de movilidad progresiva espermática. En resumen, los dendrímeros 2G-S16 y 2G-C16 son posibles candidatos a microbicidas. Sin embargo, se necesitan más estudios *in vitro* y sobre todo *in vivo* para que estos dendrímeros pudieran ser utilizados como microbicidas tópicos por las mujeres.

Debido a que el mecanismo de acción de los dos dendrímeros parecía diferente, el siguiente objetivo fue estudiar si la combinación de ambos dendrímeros tendría un efecto

sinérgico y obtener una menor transmisión e infección por el VIH-1 en células epiteliales del tracto genital femenino y en CMSP.

Se estudiaron distintas combinaciones de concentración de los dendrímeros 2G-C16 y 2G-S16 en la línea celular HEC-1A y en todos los casos se observó una mayor inhibición de la entrada del VIH-1 en el interior celular e inhibición de la replicación del VIH con el aislado viral X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub> que con el aislado viral R5 VIH-1<sub>AD8</sub>. Los mejores resultados se obtuvieron con las combinaciones de 15  $\mu$ M para ambos dendrímeros y de 10  $\mu$ M para el 2G-S16 y 30  $\mu$ M para el 2G-C16, pero en ningún caso las tasas de inhibición para esas combinaciones fueron significativas. Resultados similares se obtuvieron en los estudios de pre-tratamiento y post-tratamiento realizados en las CMSP. Aunque los mejores resultados no se obtuvieron con las mismas concentraciones de dendrímeros que se utilizaron en las HEC-1A, se observó un mayor efecto inhibitor del aislado viral X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub> que del aislado viral R5 VIH-1<sub>AD8</sub> utilizando la combinación de 10  $\mu$ M del 2G-S16 y 20  $\mu$ M del 2G-C16. En resumen, tanto en la línea celular HEC-1A como en las CMSP para obtener un mayor efecto de la inhibición del VIH-1 se necesita una combinación en la que la concentración del dendrímero 2G-C16 debe ser mayor que la del dendrímero 2G-S16. Estos datos están en consonancia con los obtenidos previamente en los estudios de modelaje computacional, donde la interacción con gp120 y CD4 es más favorable para el dendrímero 2G-S16. Por otra parte, un punto importante a tener en cuenta es el efecto de cada uno de los dendrímeros por separado y de la combinación de los dos a nivel rectal, ya que este tipo de epitelio es monoestratificado y más fácil de que se produzcan abrasión mecánica y por lo tanto más susceptibles a ser infectados.

Como se ha mencionado a lo largo de este trabajo, los microbicidas se dividen en dos grupos:<sup>262</sup> a) compuestos no específicos que por las características de su estructura química pueden inactivar directamente el VIH o pueden impedir que el virus atravesase la mucosa (por ejemplo los dendrímeros) y b) antirretrovirales.<sup>286</sup> Se han propuesto como posibles microbicidas inhibidores de la transcriptasa inversa, integrasa, proteasa principalmente el tenofovir;<sup>153</sup> e inhibidores de la entrada viral o de CCR5.<sup>159</sup> Además, como claramente se ha demostrado en el tratamiento de la infección por el VIH la combinación de diferentes antirretrovirales es más efectiva que la monoterapia<sup>287</sup> y para que los microbicidas sean más efectivos se está introduciendo en las formulaciones la combinación de al menos dos antirretrovirales. Los dos dendrímeros carbosilano aniónicos (2G-S16 y 2G-C16)<sup>104</sup> utilizados en esta Memoria han mostrado ser potenciales microbicidas. Así, la combinación

de dendrímeros carbosilano 2G-S16 y 2G-C16 con antirretrovirales que actuaran en diferentes partes del ciclo viral del VIH-1, MVC, AZT, EFV o TDF, podrían ser buenos candidatos como microbicidas de uso tópico. Los resultados obtenidos muestran un aumento de la capacidad de inhibición de la entrada/replicación del VIH con los cuatro antivirales que se han estudiado, siendo especialmente significativos los resultados obtenidos con la combinación del dendrímero 2G-S16 y los inhibidores de la transcriptasa inversa. El siguiente paso sería estudiar el efecto de la sinergia de estos compuestos en sistemas más fisiológicos como en CMSP y linfocitos T CD4<sup>+</sup> purificados y evaluar la eficacia de la combinación frente a otros patógenos de transmisión sexual. Estos resultados son prometedores, porque la sinergia entre algunos antirretrovirales y dendrímeros pueden permitir el uso de concentraciones más bajas de cada uno de los compuestos reduciendo los efectos adversos, daño local e inflamación durante el acto sexual. Además, la utilización de menor cantidad de producto podría tener un impacto en el coste de producción del microbicida facilitando el acceso a un mayor número de individuos, incluyendo a los que viven en países en desarrollo. En resumen estos resultados abren otras puertas a nuevas investigaciones.

En el proceso de la investigación y en paralelo al estudio realizado con los dendrímeros 2G-C16 y 2G-S16 se planteó el objetivo de diseñar y estudiar nuevos dendrímeros polianiónicos que pudieran mejorarlos como agentes frente a la infección por el VIH-1. En esta segunda parte de la Memoria se llevó a cabo la síntesis y estudio de ligandos sulfonados y carboxilados con complejos de metales de transición basados en níquel, cobalto, cobre y zinc con el objetivo de potenciar la actividad anti-VIH de los dendrímeros.

Tras mostrar la biocompatibilidad de estos ligandos sulfonados y carboxilados con complejos de metales en CMSP se estudió su posible papel como agentes antivirales. Aunque los ligandos en su forma de sal sódica de las familias 2, 3 y 4 no fueron tóxicos, en los experimentos de pre-tratamiento y post-tratamiento en CMSP no tuvieron prácticamente efectos inhibidores frente al VIH-1.

En los experimentos de pre-tratamiento y post-tratamiento realizados en CMSP, los complejos 2-Ni, 2-Zn, 3-Co, 4-Ni tuvieron actividad anti-VIH. Esta característica podría ser indicativa de una actividad de los ligandos como inhibidores de la fusión del virus a la célula diana. Sin embargo, como ocurrió con la familia 1,<sup>258</sup> cuando los complejos se añadían después de que las células fueran infectadas (post-tratamiento), algunos de los compuestos

también fueron capaces de inhibir la replicación del VIH-1, por lo que también podrían actuar en etapas posteriores del ciclo de replicación viral. El uso de estos complejos como post-tratamiento tras la infección por el VIH-1 tuvo un efecto inhibitor a tiempos cortos (a las 48 horas comenzaban a perder eficacia), y más rápido (a las 24 horas fueron buenos inhibidores en comparación con su sal sódica). La toxicidad de las sales sódicas fue mayor que la de los ligandos, lo que sugiere que el uso de los ligandos a concentraciones más altas podría tener un efecto mayor en la inhibición de la infección por VIH-1.

El comportamiento dual, pre- y post-tratamiento, es la mejor característica de estos compuestos, ya que combinan una actividad preventiva y terapéutica frente a la infección por el VIH-1. Debido a estos resultados y a que los análisis de espectroscopía EPR de los complejos de cobre<sup>102</sup> mostraron que el 3-Cu era un buen candidato para el desarrollo de una forma dimérica con una geometría distorsionada, con el objetivo de analizar el comportamiento sinérgico de los complejos metálicos y ligandos polianiónicos, en este caso en métalo-dendrimeros con una estructura carbono-silicio, con complejos metálicos de cobre en su periferia, se llevaron a cabo ensayos de biocompatibilidad y de inhibición de la infección por el VIH-1 en la línea celular HEC-1A y en CMSP de los nuevos cuatro métalo-dendrimeros.

Se desarrollaron nuevos métalo-dendrimeros que combinaban los dendrimeros carbosilano aniónicos previamente estudiados en el laboratorio y en esta Memoria<sup>238</sup> con complejos de cobre en su periferia. El valor añadido de estos compuestos es que presentaban dos tipos de funcionalidades con actividad antiviral, átomos de metal y cargas negativas. Se demostró la unión de los complejos de cobre a los dendrimeros carbosilanos aniónicos por ensayos de espectroscopia UV-Vis y el EPR.<sup>105</sup>

Los estudios de biocompatibilidad mostraron que los complejos no fueron tóxicos en la línea celular HEC-1A y en CMSP a concentraciones inferiores de 50  $\mu$ M. Posteriormente se realizaron los experimentos de pre-tratamiento con los métalo-dendrimeros de cobre con grupos sulfonato y carboxilato en HEC-1A y en CMSP y se mostró que en HEC-1A los compuestos con grupos carboxilato tenían mayor efecto inhibitor de la infección por el VIH-1 en comparación a sus respectivos controles, pero la inhibición fue independiente de la cantidad de cobre. Algunos de los métalo-dendrimeros mostraron un efecto inhibitor de la infección por el VIH-1 cuando las células se pre-trataron con una concentración más baja que su dendrímero control, lo que indicaba que la presencia del complejo metálico unido al



dendrímtero aumentaría el efecto inhibidor del dendrímtero por si mismo. Estos datos indican que estos métalo-dendrímteros actúan como inhibidores de la primera etapa del ciclo viral. Los resultados de los experimentos de pre-tratamiento con los métalo-dendrímteros en CMSP mostraron que los compuestos carboxilato tenían mayor actividad anti-VIH, manteniéndose esta actividad a medida que la cantidad de complejos metálicos de cobre en la periferia fue mayor. Resumiendo, cuando las células se pre-trataron con los métalo-dendrímteros se obtenía un inhibición significativamente menor de la producción de antígeno p24<sup>gag</sup> en comparación con los dendrímteros utilizados como control, indicando una mayor actividad anti-VIH.

Finalmente, cuando primero se infectaron por el VIH-1 las CMSP y posteriormente se trataron con los métalo-dendrímteros también se observó un efecto inhibidor mayor de los compuestos metálicos, principalmente a las 24 horas en comparación con los dendrímteros control. Esto implicaba un efecto inhibidor más rápido, que incrementaba cuando el compuesto tenía mayor cantidad de cobre. En resumen, la presencia del complejo metálico unido al dendrímtero aumenta el efecto inhibidor del dendrímtero, y muy importante estos compuestos pueden actuar en distintas etapas del ciclo de replicación viral. Este estudio abre una nueva vía de investigación, ya que sería de gran interés conocer en que etapas del ciclo viral actúan estos métalo-dendrímteros.

En el caso del métalo-dendrímtero de grupos sulfonato (el 2G-S16Cu8) los resultados obtenidos en pre- y post-tratamiento en HEC-1A y CMSP fueron similares a los obtenidos por su dendrímtero control (2G-S16). En conclusión, la unión de los complejos metálicos de cobre en dendrímteros con grupos sulfonato, no incrementaba su actividad anti-VIH. Esto podría deberse a los resultados obtenidos de la espectroscopía EPR a la que se hizo referencia en la segunda parte de esta Memoria, donde se mostraba que el 3-Cu es un buen candidato para el desarrollo de una forma dimérica con una geometría distorsionada. Sin embargo, la unión de complejos metálicos de cobre a los dendrímteros carboxilados (2G-C16Cu2, 2G-C16Cu4 y 2G-C16Cu6) si incrementó la actividad anti-VIH de los mismos, en los experimentos de pre-tratamiento en HEC-1A y en CMSP. El pre-tratamiento de las HEC-1A y de las CMSP durante 1 hora con 10  $\mu$ M de cada uno de los métalo-dendrímteros produjo mayor inhibición de la infección por el VIH cuando se comparó con el dendrímtero control 2G-C16. Los mismos resultados se obtuvieron cuando en primer lugar se infectaron las células y luego se trataron con los métalo-dendrímteros, obteniendo mayor efecto inhibidor con ellos que con el dendrímtero control 2G-C16. Estos datos indican que la

presencia del ión metálico coordinado con el dendrímero carbosilano de grupos carboxilato incrementa el efecto inhibitor de éste. Los metales parecen tener mayor efecto sobre los dendrímeros de grupos carboxilato (2G-C16) para inhibir la infección que sobre los dendrímeros de grupos sulfonato (2G-S16), y podrían estar implicados por un lado las cargas negativas, y por otro los metales y los cambios que pueden producir ambos factores en la unión del dendrímero al virus o al receptor CD4 o correceptores, ya que en los experimentos realizados sólo con los dendrímeros siempre se consiguió una mayor inhibición de la infección con el dendrímero 2G-S16.

Por trabajos previos en el laboratorio se conoce el papel que los dendrímeros carbosilano tienen sobre el VIH-1, ya sea como posible terapia génica,<sup>121,137</sup> o bien como bloqueantes de la transmisión del VIH-1.<sup>104</sup> En esta última parte de la Memoria se discute el posible papel de nuevos dendrímeros carbosilano de núcleo polifenólico 2G-C24P y 2G-S24P y de los dendrímeros cabosilano aniónicos 2G-S32 y 2G-C32 que tienen una estructura similar a los dendrímeros carbosilano 2G-S16 y 2G-C16, pero su síntesis se realiza por una reacción tiol-eno que tiene la ventaja de ser más sencilla y rápida y en caso de funcionar de forma similar a los dendrímeros 2G-S16 y 2G-C16 sería más fácil su traslación a la clínica. Los nuevos dendrímeros de núcleo polifenólico y de síntesis tiol-eno a concentraciones altas no fueron tóxicos en líneas celulares y en CMSP.

Al igual que los dendrímeros 2G-C16 y 2G-S16, los nuevos dendrímeros no inducían proliferación celular, no alteraban la activación celular temprana o tardía, no producían alteración de la flora vaginal, no inducían daños en la pared de la vagina, sobre todo en la concentración utilizada en los ensayos *in vitro*. Además no se detectó mortalidad ni señales de secreción vaginal, eritema o edema en las ratonas estudiadas, el pH ácido no afectó a las funciones anti-VIH de los dendrímeros y al entrar los dendrímeros en contacto con los espermatozoides no alteraban el índice de movilidad progresiva espermática. En resumen, los dendrímeros 2G-C32 y 2G-S32 son posibles nuevos candidatos a microbicidas. Sin embargo, al igual que se ha discutido con los dendrímeros 2G-S16 y 2G-C16 se necesitan más estudios *in vitro* y sobre todo *in vivo* para que estos dendrímeros pudieran ser utilizados como microbicidas tópicos.

Los dendrímeros 2G-C32 y 2G-S32 inhibieron la transmisión del VIH-1 en los primeros pasos del proceso de la infección por el VIH-1 en un modelo de monocapa transepitelial realizado *in vitro*. Estos dendrímeros también bloquearon la internalización del VIH-1 en

células epiteliales y mantuvieron la integridad de la monocapa. Como se ha discutido, la exposición directa de las células del epitelio genital al VIH-1 produce rotura de la mucosa e incrementa la entrada del VIH-1 a través del epitelio por una interacción directa entre las células epiteliales y la gp120 del VIH-1.<sup>257</sup> Los dendrímeros polianiónicos se consideran inhibidores de la entrada del VIH-1 y su mecanismo de acción se asocia a interacciones electrostáticas entre la gp120 del VIH-1 y los grupos funcionales de los polianiones que podrían prevenir la unión del virus a las células dianas.<sup>104,210</sup> Sin embargo, se desconoce el mecanismo de inhibición que utilizan estos nuevos dendrímeros, y como se ha discutido anteriormente con los dendrímeros 2G-S16 y 2C-S16 hay varias posibilidades. Por lo tanto para conocer el mecanismo de acción de estos nuevos dendrímeros hay que llevar a cabo más estudios, ya que desconocemos si podrían interaccionar con marcadores de membrana como CD4, CCR5 o CXCR4, o intervenir en una serie de eventos que inhiban alguna parte del ciclo viral.<sup>288</sup> En este punto se deberán realizar experimentos de modelaje molecular y de entrada viral.

Los resultados obtenidos en los experimentos de transmisión y entrada del VIH-1 en células epiteliales del tracto genital femenino mostraron que los dendrímeros 2G-C32 y 2G-S32 producían mayor transmisión/inhibición del VIH-1 que los dendrímeros controles 2G-C16 y 2G-S16, respectivamente. En los estudios de pre-tratamiento realizados en células epiteliales los resultados de los dendrímeros 2G-C32 y 2G-S32 fueron significativamente mejores en comparación con sus controles 2G-C16 y 2G-S16 independientemente que se trataran con virus con tropismo X4 o R5. Especialmente destacable fueron los resultados obtenidos en la inhibición de la infección de células del epitelio vaginal por virus con tropismo R5. En los experimentos de inhibición de la entrada viral, aunque los resultados no fueron tan significativos, se observó una tendencia hacia una mejor actividad de los nuevos dendrímeros. El 2G-S32 tuvo un efecto similar a su control 2G-S16 en los experimentos de entrada viral, mientras que se observó un efecto inhibitor mayor de la replicación del VIH-1 del 2G-S32 en comparación con el control 2G-S16. Sin embargo, el 2G-C32 presentó un mayor efecto inhibitor respecto a su control 2G-C16 tanto en la entrada viral como en la producción de nuevas partículas virales. Estos resultados indican que los nuevos dendrímeros podrían estar actuando en otras etapas del ciclo viral y habrá que realizar diseños de nuevos experimentos para conocer el mecanismo de inhibición de la entrada del virus y sobre todo en qué puntos del ciclo del VIH-1 están actuando para inhibir la producción de nuevas partículas virales. Finalmente, aunque los dendrímeros de núcleo polifenólico 2G-C24P y 2G-S24P tuvieron actividad anti-VIH en ninguno de los

experimentos fue mejor que cuando se utilizaron sus controles 2G-C16 y 2G-S16, respectivamente.

Con estos nuevos dendrímeros también se realizaron experimentos con los tres aislados virales con tropismo R5 procedentes de individuos VIH+ en la línea celular HEC-1A. Los resultados, aunque preliminares, demostraron que los dendrímeros presentaban capacidad antiviral frente a la infección por virus procedente de individuos VIH+, incluso para los dendrímeros 2G-S32 y 2G-C32 la inhibición de la producción de antígeno p24<sup>gag</sup> fue mayor que la obtenida por los dendrímeros controles 2G-S16 y el 2G-C16. Como ya se ha discutido anteriormente en esta Memoria, no se puede ignorar ninguno de los tropismos virales implicados en la infección por el VIH a la hora de desarrollar nuevas estrategias antivirales que conlleven el uso de un microbicida de uso tópico, ya que tanto en el tracto genital femenino como en la mucosa rectal se encuentran de manera abundante células T CD4+ y otros tipos celulares que expresan los principales correceptores para el VIH, el CXCR4 y CCR5.<sup>289-290</sup>

Para concluir, y como ensayo preliminar, se llevaron a cabo experimentos para evaluar si distintos pH pudieran afectar a las características antivirales de los dendrímeros, ya que como se ha descrito en trabajos anteriores, la vagina humana presenta un pH bajo,<sup>29</sup> además de que pH bajos disminuyen la solubilidad de los compuestos desarrollados como microbicidas, y en compuestos polianiónicos, el efecto del pH puede ser aún mayor.<sup>149</sup> En primer lugar, los compuestos deben ser solubles y biodisponibles en un amplio intervalo de valores de pH. En segundo lugar, dada la relación entre la carga molecular y el pH, las moléculas que dependen de la carga para la actividad antiviral deben permanecer funcionales a pesar de las variaciones en el pH que se producen durante las relaciones sexuales. Para ello se realizó un ensayo en el que se comprobó si diferentes variaciones en el pH podían afectar negativamente a la capacidad antiviral de los dendrímeros. Al tratarse de un ensayo preliminar solo se realizó en los dendrímeros carbosilano aniónicos con grupos sulfonato en la periferia, ya que fueron los que mejores características presentaban. Los datos fueron concluyentes, ya que en ningún caso la capacidad antiviral de los dendrímeros se vio afectada, ni cuando el pH utilizado para su solubilidad presentaba valores muy ácidos (pH 3), ni cuando para la solubilidad se utilizó un plasma seminal.

Desde mediados de los noventa se ha puesto el punto de mira de la investigación para evitar la transmisión del VIH-1 y una posibilidad es el desarrollo de nanopartículas como

microbicida que actúe en el mecanismo de entrada del VIH-1 a través del epitelio vaginal.<sup>29</sup> En esta Memoria se han caracterizado nuevos dendrímeros carbosilano aniónicos de segunda generación, solubles en agua principalmente como candidatos a microbicida. Precisamente la solubilidad en agua, junto con los datos que describen la biocompatibilidad y la actividad anti-VIH de estos dendrímeros son datos clave para fundamentar su potencial uso terapéutico, en especial para su futuro desarrollo como microbicida. Especial mención cabría darles a los dos nuevos dendrímeros de síntesis tiol-eno, el 2G-S32 y el 2G-C32 que por sus características químicas y los resultados obtenidos presentan un gran potencial como inhibidores de la transmisión del VIH-1 y para su traslación a la clínica. Así mismo no hay que olvidar el estudio combinado de dendrímeros de diferentes características entre sí y de dendrímeros con antirretrovirales, ya que lo que realmente ha funcionado en el tratamiento de los individuos infectados por el VIH ha sido la combinación de antirretrovirales. Esta Memoria abre la posibilidad de continuar con nuevos estudios para el desarrollo de los nuevos compuestos y de las posibles combinaciones de compuestos como microbicidas de uso tópico para evitar la transmisión del VIH-1.



## ***6. CONCLUSIONES***





## 6. CONCLUSIONES



1. Los dendrímeros carbosilano aniónicos 2G-C16 y 2G-S16 tienen buena biocompatibilidad en distintas líneas celulares. No producen activación de CMSP ni modifican la expresión de receptores y correceptores celulares implicados en la entrada del VIH-1 en CMSP. No alteran la flora vaginal, ni afectan a la viabilidad de los espermatozoides, ni a la pared del epitelio vaginal en ratonas CD-1a. Estos dendrímeros inhiben la entrada y transmisión de distintos aislados virales en células epiteliales y CMSP, siendo siempre mayor la inhibición con el dendrímero 2G-S16.
2. Los estudios de modelaje computacional nos dan una aproximación del mecanismo de acción, indicando que del 2G-S16 se uniría preferentemente a la gp120 del VIH y el 2G-C16 se uniría a gp120 y CD4, aunque de manera más débil debido a su carácter bipolar.
3. Las sinergias de 2G-S16 y 2G-C16 no incrementan la inhibición de la infección por VIH-1 en comparación con el uso de ambos dendrímeros por si solos. La sinergia de 2G-S16 y 2G-C16 con antirretrovirales incrementa la inhibición de la infección por el VIH-1.
4. Los métalo-dendrímeros 2G-S16Cu8, 2G-C16Cu2, 2G-C16Cu4 y 2G-C16Cu6 tienen buena biocompatibilidad en CMSP y células epiteliales. La unión del complejo metálico de Cu al dendrímero 2G-C16 favorece su capacidad antiviral.
5. Los dendrímeros carbosilano aniónicos de síntesis tiol-eno 2G-S32 y 2G-C32 y los de núcleo polifenólico 2G-S24P y 2G-C24P presentan buena biocompatibilidad, no inducen activación celular, ni cambios en el receptor o correceptores de la superficie celular y no afectan al epitelio vaginal de ratonas. Además, la presencia de estos dendrímeros disminuye la transmisión del VIH-1 a través de una monocapa de células epiteliales sin alterarla. Estos dendrímeros inhiben la entrada y transmisión de distintos aislados virales en células epiteliales y CMSP, siendo mayor la inhibición producida por los dendrímeros 2G-S32 y 2G-C32. La capacidad antiviral se mantuvo a diferentes pH.



## ***7. ANEXOS***



## 7. ANEXOS



BASIC RESEARCH

www.jasn.org

## CTGF Promotes Inflammatory Cell Infiltration of the Renal Interstitium by Activating NF- $\kappa$ B

Elsa Sánchez-López,\* Sandra Rayego,\* Raquel Rodríguez-Díez,\* Javier Sánchez Rodríguez,\* Raúl Rodríguez-Díez,\* Juan Rodríguez-Vita,\* Gisselle Carvajal,<sup>†</sup> Luiz Stark Aroeira,<sup>‡</sup> Rafael Selgas,<sup>§</sup> Sergio A. Mezzano,<sup>†</sup> Alberto Ortiz,<sup>§</sup> Jesús Egido,<sup>||</sup> and Marta Ruiz-Ortega\*

\*Cellular Biology in Renal Diseases Laboratory, Universidad Autónoma Madrid, Madrid, Spain; <sup>†</sup>Division of Nephrology, School of Medicine, Universidad Austral, Valdivia, Chile; <sup>‡</sup>Servicio de Nefrología, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain; <sup>§</sup>Dialysis Unit, Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain; and <sup>||</sup>Renal Research Laboratory, Fundación Jiménez Díaz, Universidad Autónoma Madrid, Madrid, Spain

### ABSTRACT

Connective tissue growth factor (CTGF) is an important profibrotic factor in kidney diseases. Blockade of endogenous CTGF ameliorates experimental renal damage and inhibits synthesis of extracellular matrix in cultured renal cells. CTGF regulates several cellular responses, including adhesion, migration, proliferation, and synthesis of proinflammatory factors. Here, we investigated whether CTGF participates in the inflammatory process in the kidney by evaluating the nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) pathway, a key signaling system that controls inflammation and immune responses. Systemic administration of CTGF to mice for 24 h induced marked infiltration of inflammatory cells in the renal interstitium (T lymphocytes and monocytes/macrophages) and led to elevated renal NF- $\kappa$ B activity. Administration of CTGF increased renal expression of chemokines (MCP-1 and RANTES) and cytokines (INF- $\gamma$ , IL-6, and IL-4) that recruit immune cells and promote inflammation. Treatment with a NF- $\kappa$ B inhibitor, parthenolide, inhibited CTGF-induced renal inflammatory responses, including the up-regulation of chemokines and cytokines. In cultured murine tubuloe epithelial cells, CTGF rapidly activated the NF- $\kappa$ B pathway and the cascade of mitogen-activated protein kinases, demonstrating crosstalk between these signaling pathways. CTGF, via mitogen-activated protein kinase and NF- $\kappa$ B activation, increased proinflammatory gene expression. These data show that in addition to its profibrotic properties, CTGF contributes to the recruitment of inflammatory cells in the kidney by activating the NF- $\kappa$ B pathway.

*J Am Soc Nephrol* 20: 1513–1526, 2009. doi: 10.1681/ASN.2008090999

Connective tissue growth factor (CTGF) is a member of the C-terminal cystein-rich proteins (CCN) family of early response genes. CTGF is a 38-kD cystein-rich secreted protein that is up-regulated in proliferative disorders or fibrotic lesions in several human diseases, including skin disorders, atherosclerosis, pulmonary fibrosis, and kidney diseases.<sup>1,2</sup> In human biopsies of different renal pathologies and in experimental models of kidney injury, renal CTGF overexpression was correlated with cellular proliferation and extracellular matrix (ECM) accumulation, both at glomerular and interstitial areas.<sup>2–4</sup> In the diabetic kidney, elevated CTGF expression co-localizes with sites of epithelial-to-mes-

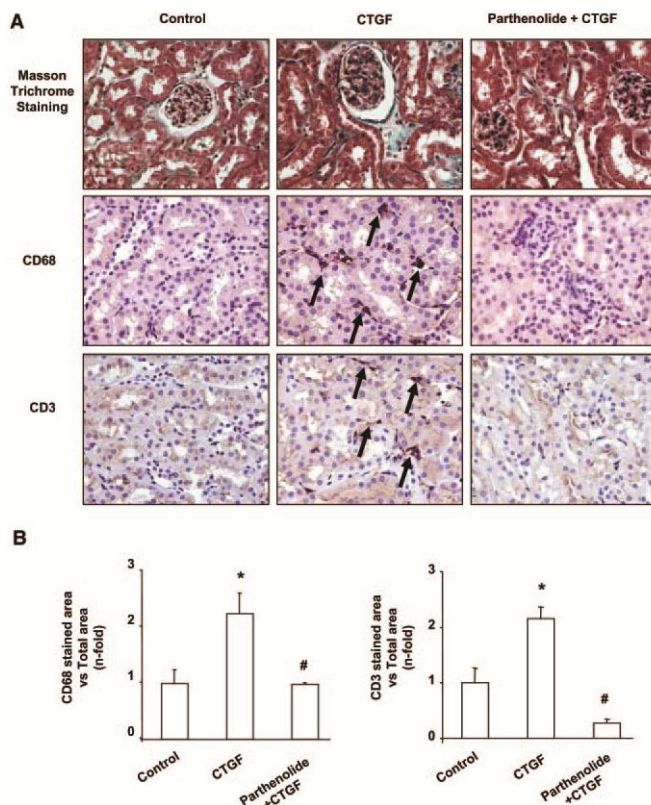
enchymal transition (EMT) on the tubular epithelium.<sup>5</sup> In cultured renal cells, recombinant CTGF significantly increases ECM production and induces transition of tubuloe epithelial cells to myofibroblasts.<sup>6–8</sup> In experimental diabetic nephropathy

Received September 22, 2008. Accepted February 26, 2009.

Published online ahead of print. Publication date available at [www.jasn.org](http://www.jasn.org).

**Correspondence:** Marta Ruiz-Ortega, Cellular Biology in Renal Diseases Laboratory, Fundación Jiménez Díaz, Avda. Reyes Católicos, 2, 28040 Madrid, Spain. Phone: 34-91-5504821; Fax: 34-91-5442636; E-mail: [mruizo@fdj.es](mailto:mruizo@fdj.es)

Copyright © 2009 by the American Society of Nephrology



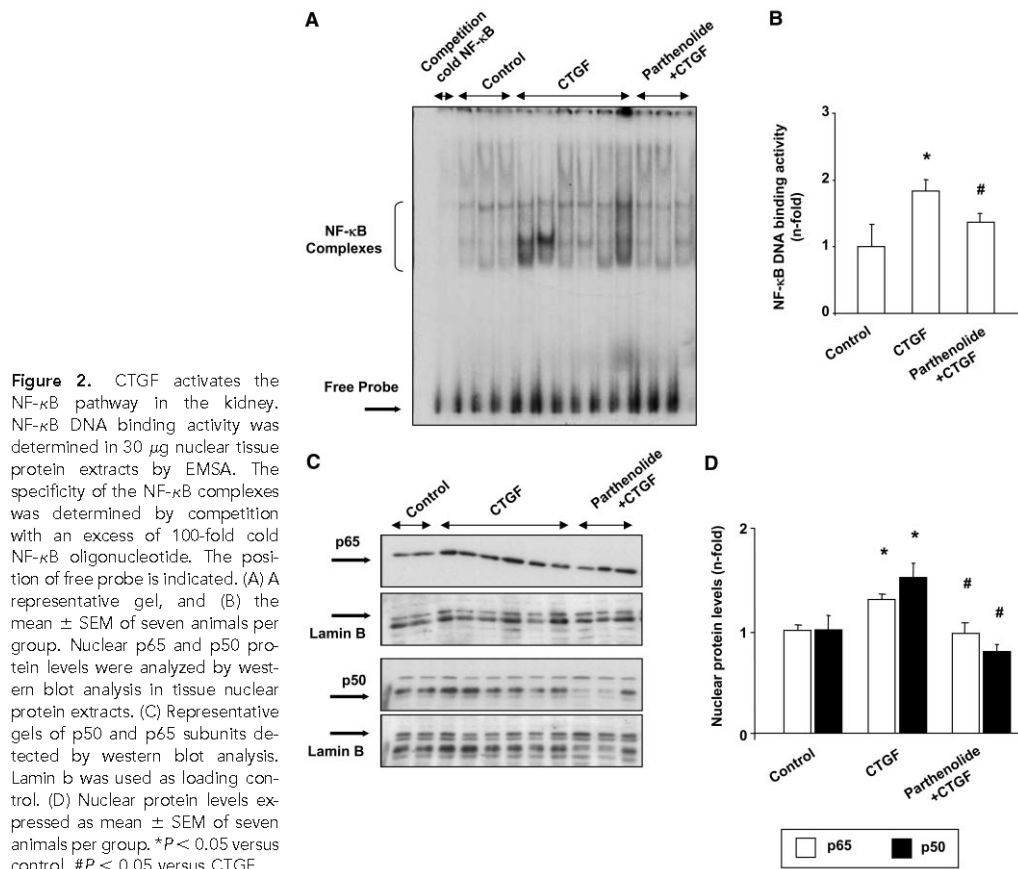
**Figure 1.** CTGF causes tubulointerstitial inflammatory cell infiltration in the kidney, and NF- $\kappa$ B inhibition ameliorates CTGF induced renal injury. Animals were injected with 2.5 ng/g recombinant CTGF or saline and killed 24 h later. Some animals were pretreated 24 h before with 3.5 mg/g parthenolide (NF- $\kappa$ B inhibitor) or its vehicle (0.05% DMSO, control group) before CTGF administration. Paraffin-embedded kidney sections were studied. (A) Representative Masson trichrome and immunohistochemistry stainings. Inflammatory cell infiltration was evaluated using anti-CD68 (macrophages) and anti-CD3 (T lymphocytes) antibodies. Arrows indicate stained interstitial inflammatory cells. Magnification,  $\times 400$ . (B) Immunohistochemistry staining quantification expressed as mean  $\pm$  SEM of seven animals per group. \* $P < 0.05$  versus control. # $P < 0.05$  versus CTGF.

in mice, the blockade on endogenous CTGF, by antisense oligonucleotides, has beneficial effects on renal damage progression.<sup>9</sup> In cultured renal cells, CTGF blockade inhibits ECM accumulation and EMT caused by angiotensin II and transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ).<sup>3,10</sup> These data suggest that CTGF could be an important target for the treatment of renal fibrosis.

CTGF also induces other cellular responses. Depending on the cell type, CTGF regulates cell growth, proliferation, and apoptosis. CTGF is a downstream mediator of TGF- $\beta$ -induced apoptosis of mesothelial cells,<sup>11</sup> but contributes to the survival of hepatic stellate cells.<sup>12</sup> CTGF may play a role as a secreted tumor suppressor protein<sup>13</sup> or contribute to promote tumor cell growth and invasion.<sup>14</sup> Some studies suggested that CTGF could also be involved in the inflammatory response. CTGF is a chemotactic factor for monocytes<sup>15</sup> and regulates cellular adhesion and migration in mesangial cells.<sup>16</sup> Moreover, in cultured mesangial cells, CTGF enhances the production of proinflammatory factors, including chemotactic molecules, and activates nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B).<sup>17</sup> However,

there is no data about the *in vivo* effect of CTGF on the renal inflammatory process.

The molecular mechanisms involved in CTGF signaling are far from being understood. CTGF interacts with tyrosine kinase receptors and integrins that activate multiple signaling systems including NF- $\kappa$ B and mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways.<sup>12,17–19</sup> Although the regulation of the inflammatory response in the kidney is a complex process, the activation of NF- $\kappa$ B plays a pivotal role. Experimental studies have shown that NF- $\kappa$ B blockade by different methods, including I- $\kappa$ B overexpression, NF- $\kappa$ B decoy oligonucleotides, NF- $\kappa$ B inhibitors (parthenolide among others), or indirectly by statins, glucocorticoids, and antioxidants, prevents renal damage.<sup>20–23</sup> Activation of renal NF- $\kappa$ B has been described in human kidney diseases, associated to proinflammatory factors overexpression.<sup>24,25</sup> We have now investigated whether CTGF could modulate the inflammatory response in the kidney and the mechanisms underlying this process, evaluating the involvement of the NF- $\kappa$ B signaling pathway.



**Figure 2.** CTGF activates the NF-κB pathway in the kidney. NF-κB DNA binding activity was determined in 30 μg nuclear tissue protein extracts by EMSA. The specificity of the NF-κB complexes was determined by competition with an excess of 100-fold cold NF-κB oligonucleotide. The position of free probe is indicated. (A) A representative gel, and (B) the mean ± SEM of seven animals per group. Nuclear p65 and p50 protein levels were analyzed by western blot analysis in tissue nuclear protein extracts. (C) Representative gels of p50 and p65 subunits detected by western blot analysis. Lamin b was used as loading control. (D) Nuclear protein levels expressed as mean ± SEM of seven animals per group. \**P* < 0.05 versus control. #*P* < 0.05 versus CTGF.

## RESULTS

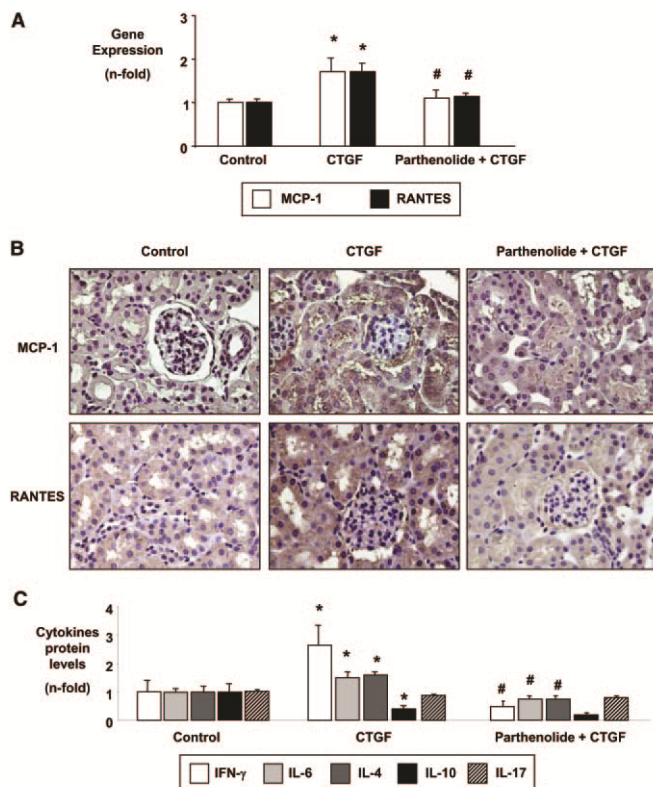
### Systemic Administration of CTGF Induces Interstitial Inflammatory Cell Infiltration in the Kidney

To investigate the *in vivo* effect of CTGF in the kidney, a model of acute administration of CTGF in mice was performed. C57Bl/6 mice were intraperitoneally injected with human recombinant CTGF (2.5 ng/g of body weight) and studied 24 h later. As control, a group of vehicle-injected (saline) mice was used. CTGF-injected mice did not present marked histologic changes in the kidney after 24 h (Figure 1A; Masson Trichrome staining), we just observed focal interstitial inflammatory cell infiltration when compared with the control group. CTGF-treated mice had a marked increase of CD68 positive macrophages and CD3 positive T lymphocytes in interstitial areas (Figure 1A) that were not found in control mice (Figure 1B shows staining quantification).

Renal function was also evaluated. There were no statistically significant differences in urea ( $24 \pm 4$  mg/dl in controls versus  $30 \pm 2$  mg/dl in CTGF-injected mice, *P* = 0.124) and creatinine plasma levels ( $0.09 \pm 0.03$  mg/dl versus  $0.06 \pm 0.01$  mg/dl, *P* = 0.171) or in the urinary protein/creatinine ratio ( $3.84 \pm 0.27$  versus  $5.33 \pm 1$ , *P* = 0.356) between controls and CTGF-injected mice. This suggests that CTGF does not induce loss of renal function.

### CTGF Activates the NF-κB Pathway in the Kidney

In nuclear protein extracts of kidneys from mice treated with CTGF, NF-κB DNA binding activity was increased compared with controls, as assessed by electrophoretic mobility shift assay (EMSA) (Figure 2, A and B). Moreover, CTGF-injected mice had increased nuclear p50 and p65 protein levels compared with control animals, as shown by western blot analysis (Figure 2, C and D). These data indicate that CTGF activates the renal NF-κB pathway *in vivo*.



**Figure 3.** In vivo CTGF increases renal expression of chemokines and proinflammatory cytokines through the NF- $\kappa$ B pathway. (A) MCP-1 and RANTES gene expression as mean  $\pm$  SEM of seven animals per group analyzed by real-time PCR. (B). Immunohistochemistry for MCP-1 and RANTES. A representative animal out of six studied in each group is shown. Magnification,  $\times 400$ . (C). In renal extracts, cytokine levels were evaluated by ELISA and shown as mean  $\pm$  SEM of seven animals per group. \* $P < 0.05$  versus control. # $P < 0.05$  versus CTGF.

#### Blockade of the NF- $\kappa$ B Pathway Diminishes CTGF-Induced Inflammatory Cell Infiltration in the Kidney

To test the *in vivo* contribution of NF- $\kappa$ B activation to CTGF responses, animals were pretreated with the NF- $\kappa$ B inhibitor parthenolide (3.5 mg/g of body weight) 24 h before CTGF administration. As a control, some animals were injected with 0.05% DMSO (parthenolide vehicle), showing no difference with saline-injected mice. Parthenolide is a sesquiterpene lactone that inhibits NF- $\kappa$ B activation by preventing the degradation of I- $\kappa$ B $\alpha$ .<sup>26</sup> This NF- $\kappa$ B inhibitor has previously shown beneficial effects in several experimental models of renal damage.<sup>22,27</sup> Treatment with parthenolide ameliorated CTGF-induced renal damage and markedly diminished the presence of infiltrating monocytes/macrophages and T cells in renal inter-

stitium (Figure 1). Parthenolide significantly diminished renal NF- $\kappa$ B activation caused by CTGF (Figure 2). These data suggest that NF- $\kappa$ B is an important intracellular signaling pathway involved in CTGF-induced renal responses.

#### CTGF Increases the Renal Expression of Chemokines and Proinflammatory Cytokines Via NF- $\kappa$ B Activation

The local renal production of chemokines, some of them under NF- $\kappa$ B control, regulates inflammatory cell infiltration.<sup>20</sup> In CTGF-injected mice, the renal mRNA expression of the chemokines monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and RANTES (regulated on activation normal T cell expressed and secreted) was significantly up-regulated compared with control animals (real-time PCR, Figure 3A). The expression of both chemokines at the protein level was confirmed by immunohistochemistry. MCP-1 and RANTES positive staining was observed in tubulointerstitial cells and interstitial infiltrating cells (Figure 3B). Treatment with the NF- $\kappa$ B inhibitor parthenolide restored MCP-1 and RANTES gene and protein expression to control levels (Figure 3, A and B), suggesting that NF- $\kappa$ B signaling participates in their regulation.

Kidneys from CTGF-treated mice presented elevated levels of the T helper (Th) 1/2 cytokines IFN- $\gamma$ , IL-6, and IL-4 compared with control mice, which were abolished by parthenolide pretreatment (Figure 3C). By contrast, IL-10 (main regulatory T cells cytokine secreted) was down-regulated by CTGF, but was not modified by NF- $\kappa$ B inhibition (Figure 3C). CTGF has no effect on IL-17 production, the main cytokine secreted by TH17 cells, showing that

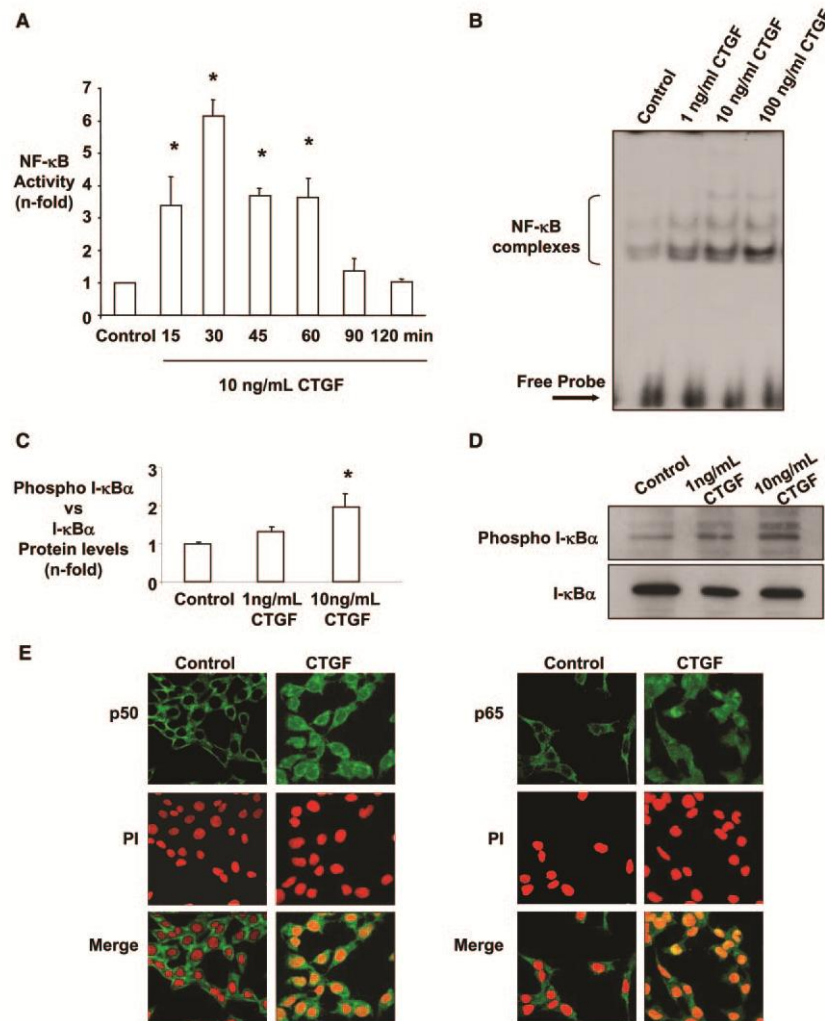
TH17 response was not activated by CTGF (Figure 3C).

#### CTGF Activates the NF- $\kappa$ B Pathway in Tubulointerstitial Cells

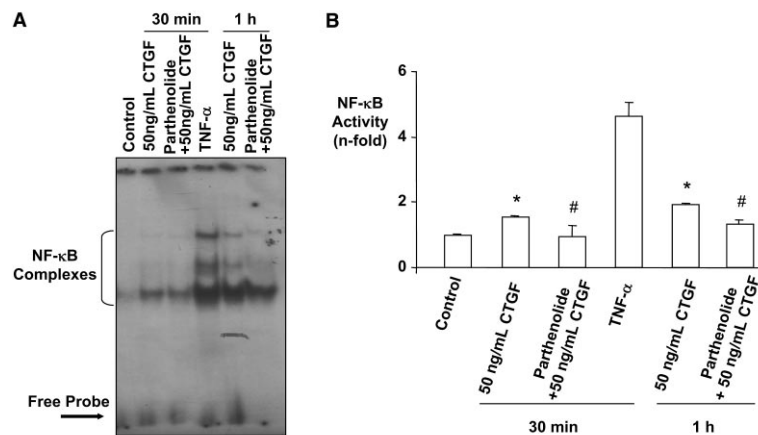
To further investigate the mechanism involved in the inflammatory effects of CTGF in the kidney, experiments were performed in cultured murine proximal tubulointerstitial cells (MCT cells), an important cell implicated in renal inflammation.<sup>28</sup>

First, we evaluated whether CTGF could activate the NF- $\kappa$ B pathway in these cells. In MCTs, increased NF- $\kappa$ B DNA binding activity in response to CTGF was observed as soon as 15 min, peaked at 30 min, and returned to control levels at 2 h (Figure 4, A and B). CTGF induced a dose-dependent NF- $\kappa$ B





**Figure 4.** CTGF activates the NF-κB pathway in murine tubuloeptithelial cells. Murine tubuloeptithelial cells (MCT cell line) were growth-arrested for 24 h and then stimulated with 10 ng/ml CTGF. NF-κB DNA binding activity was determined in 10 μg nuclear extracts by EMSA. (A) The time-response curve as mean ± SEM of three experiments is shown. \**P* < 0.05 versus control. (B) A representative dose-response EMSA after 30 min of CTGF incubation, out of three performed. (C) Phosphorylated I-κBα versus I-κBα protein levels as mean ± SEM of three experiments of western blot analysis. (D) Phosphorylated I-κBα and I-κBα representative gels of western blot analysis of three experiments performed. (E) CTGF causes nuclear translocation of p50 and p65 NF-κB subunits in MCT. Cells were treated with 10 ng/ml CTGF for 30 min. Indirect immunofluorescence was done using p50 and p65 antibodies and FITC-labeled secondary antibodies (green staining). Nuclei were stained with propidium iodide (PI, in red). In the merge confocal microscopy image, the yellow color indicates nuclear localization of NF-κB subunits. A representative experiment out of three performed for each subunit is shown.



**Figure 5.** CTGF activates the NF- $\kappa$ B pathway in HK-2 cells. Human tubuloe epithelial cells (HK-2 cell line) were growth-arrested for 24 h and were pretreated with parthenolide (NF- $\kappa$ B inhibitor  $10^{-6}$  M) for 1 h. Then they were stimulated with 50 ng/ml CTGF for 30 min and 1 h. NF- $\kappa$ B DNA-binding activity was determined in 10  $\mu$ g nuclear extracts by EMSA. (A) A representative gel of NF- $\kappa$ B activation by EMSA. (B) NF- $\kappa$ B activation levels as mean  $\pm$  SEM of three experiments. \* $P$  < 0.05 versus control. # $P$  < 0.05 versus CTGF.

activation, with a maximal response between 10 to 100 ng/ml (Figure 4A). CTGF also induced the phosphorylation and consequent degradation of the cytosolic inhibitory subunit I- $\kappa$ B $\alpha$ , observed at 30 min, the time of the maximal NF- $\kappa$ B activation (western blot analysis, Figure 4, C and D). By immunofluorescence, we have located NF- $\kappa$ B subunits. In control cells, a diffuse cytoplasmic fluorescence was seen with anti-p50 and anti-p65 antibodies. After 30 min with CTGF, an intense nuclear fluorescence was noted, showing a translocation of p50 and p65 NF- $\kappa$ B subunits into the nucleus (Figure 4E). By transient transfection of MCT cells with a NF- $\kappa$ B-luciferase reporter vector, we have found that CTGF significantly increased NF- $\kappa$ B promoter activity, similar to that observed with TNF- $\alpha$  (not shown), indicating NF- $\kappa$ B-dependent gene transcription.

To further study NF- $\kappa$ B activation induced by CTGF, we evaluated this effect in human tubuloe epithelial cell line (HK-2). In these cells, CTGF activates the NF- $\kappa$ B transcription factor as soon as 30 min, remaining elevated after 1 h; but a higher dose than in MCT cells is required (50 ng/ml) (Figure 5).

#### CTGF Activates the NF- $\kappa$ B Pathway Through MAPK Activation in Murine Tubuloe epithelial Cells

To investigate the upstream mechanisms involved in NF- $\kappa$ B activation induced by CTGF, we have studied the MAPK cascade. First, we have evaluated whether CTGF could activate the MAPK signaling pathway in MCTs. By western blot analysis, we have observed that CTGF increased the phosphorylation of JNK1/2 at 10 min, ERK1/2 at 15 min, and p38 at 20 min (Figure 6, A and B), preceding the maximal NF- $\kappa$ B activation. The potential role of MAPKs in NF- $\kappa$ B activation was studied using specific inhibitors of ERK1/2 (PD98059), p38 (SB203580), and JNK (SP600125).<sup>8</sup> Treatment with any of the inhibitors re-

duced NF- $\kappa$ B DNA binding activity (Figure 7, A and B) and p65 nuclear translocation (Figure 7C) caused by CTGF, showing the involvement of all three MAPKs, ERK1/2, p38, and JNK, in this process.

#### CTGF Increases the Production of Proinflammatory Mediators in Tubuloe epithelial Cells

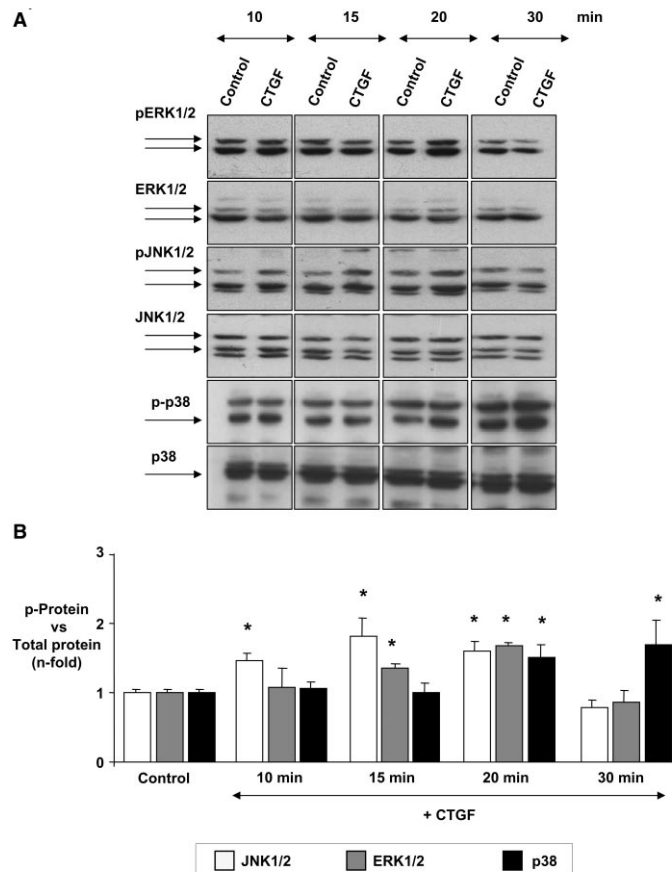
We have also investigated whether CTGF regulates some proinflammatory factors under NF- $\kappa$ B control in MCTs. By real-time PCR, we have found that in MCTs, CTGF up-regulated gene expression of the chemokine MCP-1, the intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and the cytokine IL-6. Parthenolide prevented the up-regulation of these proinflammatory mediators (Figure 8). Moreover, treatment with specific inhibitors of ERK1/2 (PD98059), p38 (SB203580), and JNK (SP600125) reduced MCP-1 gene expression to control levels. However, ICAM-1 gene overexpression was reduced by p38 and JNK inhibition, and only the inhibition of JNK diminished IL-6 overexpression induced by CTGF.

We also observed that CTGF induces IL-6, MCP-1, and ICAM-1 overexpression after 6 h in HK-2 cells (Figure 9) through NF- $\kappa$ B pathway activation.

#### DISCUSSION

In this work, we have demonstrated that CTGF *in vivo* promotes renal inflammatory cell infiltration via NF- $\kappa$ B pathway activation and up-regulation of proinflammatory mediators.

Previous studies suggested that CTGF could participate in the regulation of the inflammatory process. CTGF is a chemotactic factor for cultured monocytes<sup>15</sup> and participates in mes-



**Figure 6.** CTGF activates ERK1/2, JNK1/2, and p38 pathways in MCT cells. MCT cells were serum-deprived for 24 h and then stimulated with 10 ng/ml CTGF. Increased phosphorylated protein levels are considered evidence of MAPK pathway activation. (A) A representative gel for ERK1/2, JNK1/2 and p38 phosphorylated, and total proteins, and (B) mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \* $P < 0.05$  versus control.

angial migration and adhesion.<sup>16</sup> We have observed that the systemic administration of CTGF in mice leads to tubulointerstitial infiltration of macrophages and T cells. These data are the first evidence clearly showing that CTGF contributes to renal inflammation *in vivo*.

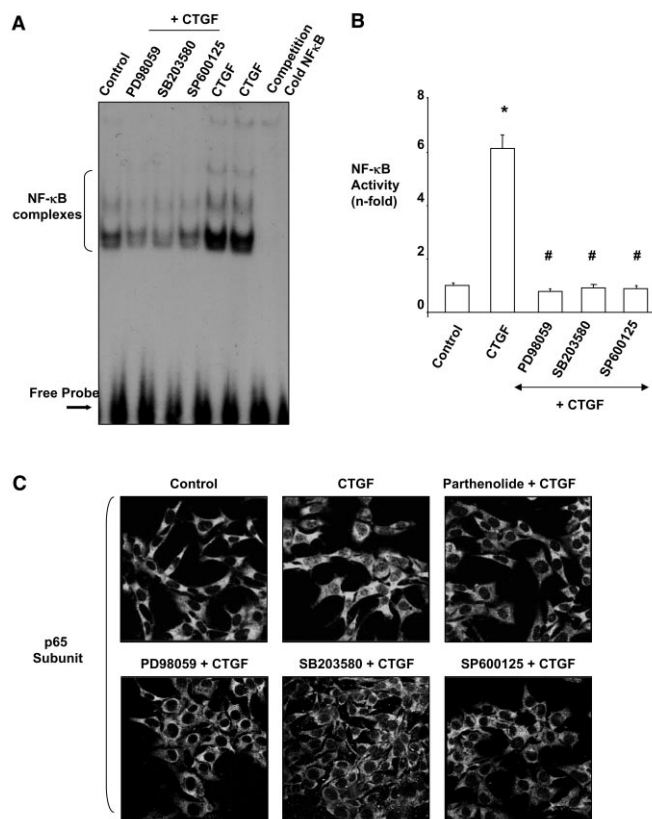
Among the intracellular signaling system involved in the regulation of inflammatory and immune responses, NF- $\kappa$ B has special interest. NF- $\kappa$ B is a transcription factor that regulates the gene expression of proinflammatory mediators, including chemokines and cytokines, that contribute to the recruitment of inflammatory cells in the renal tissue.<sup>20,21</sup> We

have observed that CTGF activates the NF- $\kappa$ B pathway in the kidney, and this is associated with increased tubulointerstitial cell expression of chemokines and recruitment of interstitial macrophages and T cells. Moreover, the blockade of NF- $\kappa$ B activation by pretreatment with parthenolide inhibited chemokines overexpression and inflammatory cell infiltration induced by CTGF. These data show that NF- $\kappa$ B is an important signaling pathway involved in the inflammatory response elicited by CTGF in the kidney.

We have further investigated the mechanisms involved in NF- $\kappa$ B activation by CTGF in cell culture studies. In renal tubulointerstitial cells, CTGF induced a transient increase in NF- $\kappa$ B DNA binding activity. NF- $\kappa$ B proteins are associated with I- $\kappa$ B proteins and retained in the cytoplasm where they are inactive. Activation of the classical NF- $\kappa$ B pathway consists of the dissociation of the inhibitory subunit I- $\kappa$ B $\alpha$  from the complex and its subsequent degradation. Then the active NF- $\kappa$ B complex is translocated to the nucleus where it activates the transcription of target genes.<sup>20,21</sup> CTGF elicited nuclear translocation of p65 and p50 subunits and decreased cytosolic I- $\kappa$ B $\alpha$  levels, indicative of I- $\kappa$ B $\alpha$  degradation, with a time-course consistent with the DNA binding assay. CTGF also increased NF- $\kappa$ B-dependent gene transcription and up-regulated the expression of NF- $\kappa$ B-controlled genes, such as MCP-1, IL-6, and ICAM-1, involved in the inflammatory response. These data show that CTGF activates the classical NF- $\kappa$ B, linked to inflammation, and are consistent with the observed *in vivo* effects in the kidney. In addition, previously re-

ported NF- $\kappa$ B activation in cultured hepatic, mesangial, and pancreatic cells support our findings.<sup>12,17,29</sup> Moreover, we have demonstrated that CTGF increases NF- $\kappa$ B activation and induces MCP-1, IL-6, and ICAM-1 overexpression in HK-2 cell line, corroborating that this CTGF effect is not cell type-specific response.

Chemokines are important mediators in the recruitment of specific subpopulations of inflammatory cells into renal compartments. MCP-1/CCL2 has a key role in monocyte/macrophage recruitment in animal models of renal injury and in renal biopsies from patients with type 1 and 2 diabetes.<sup>30</sup> Ex-



**Figure 7.** MAPK pathway inhibition abolishes NF-κB activation caused by CTGF in MCT cells. Growth-arrested cells were pretreated with p38 inhibitor (SB203580;  $10^{-5}$  mol/L), ERK1/2 inhibitor (PD98059;  $10^{-5}$  mol/L), and JNK inhibitor (SP600125;  $10^{-5}$  mol/L). Then cells were treated with 10 ng/ml CTGF for 30 min. (A) A representative EMSA out of three performed, and (B) mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \* $P < 0.05$  versus control. # $P < 0.05$  versus CTGF. (C) Representative confocal microscopy images of p65 immunofluorescence staining out of three independent experiments.

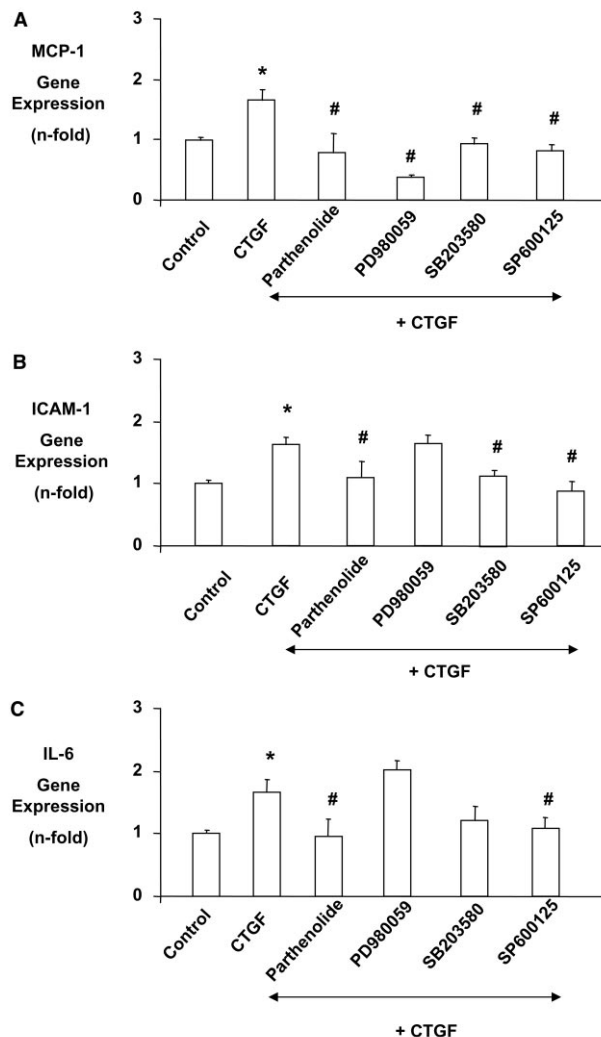
perimental blockade of MCP-1 has demonstrated the involvement of this chemokine in the pathogenesis of progressive glomerular and tubulointerstitial lesions in different animal models of renal damage. T lymphocyte recruitment is influenced by up-regulation of RANTES/CCL5.<sup>31</sup> Systemic administration of CTGF in mice induces the renal production of chemotactic mediators, such as MCP-1 and RANTES, mainly located in tubuloe epithelial cells. During kidney damage, tubuloe epithelial cells are activated and acquire a proinflammatory phenotype, contributing to inflammatory cell recruitment. Moreover, the direct contact between activated Th2 cells and

tubuloe epithelial cells can amplify the local inflammatory response in the kidney, through the production of inflammatory mediators.

As we have noted, CTGF could regulate the Th1 or Th2 responses. Th1 cells secrete one characteristic set of cytokines, namely IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12, IL-18, and CD40L, and evoke cell-mediated immunity and phagocyte-dependent inflammation. Th2 cells, which secrete another set of cytokines, such as IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, and IL-13, evoke strong antibody responses (including those of the IgE class) and eosinophil accumulation, but inhibit several functions of phagocytic cells (phagocyte-independent inflammation).<sup>32</sup> IFN- $\gamma$  participates in renal damage through the regulation of immune cell migration contributing to the accumulation of inflammatory cells, mainly macrophages and leukocytes, in the injured kidney.<sup>33,34</sup> IL-6 is expressed by tubuloe epithelial cells in human acute and chronic renal disease.<sup>35,36</sup> In renal cells, IL-6 and IL-4 induce the production of cytokines, chemokines, ECM proteins, and regulate cell growth.<sup>37,38</sup> IL-4 amplifies the response of other cytokines. In tubuloe epithelial cells, IL-4 increases CD40-induced RANTES production.<sup>39</sup> CTGF-injected mice presented elevated renal production of the cytokines IFN- $\gamma$  (Th1) and IL-4 and IL-6 (Th2), that were down-regulated by NF-κB inhibition. IL-10 inhibits the production of proinflammatory cytokines, chemokines, and growth factors controlling tissue damage and exerts beneficial effects in experimental models of renal damage.<sup>40,41</sup> In mice, renal IL-10 was down-regulated by CTGF, indicating that CTGF not only increases proinflammatory mediators but also down-regulates anti-inflammatory cytokines, such as IL-10.

Recent studies have described that some T cells could differentiate in IL-17 secreting cells, inducing TH17 response.<sup>42</sup> The presence of TGF- $\beta$  and IL-6 gives origin to murine TH17 cells, however human TH17 cells appear to originate in response to IL-23 and IL-1 $\beta$ .<sup>43</sup> CTGF acute administration did not increase IL-17 production, showing that TH17 responses is not activated in the kidney of these animals.

Inflammatory molecules increase NF-κB activity through multiple signaling pathways depending on cell type. Previous studies have demonstrated the relation between MAPK and NF-κB pathways.<sup>44</sup> CTGF activates MAPK cascade in several

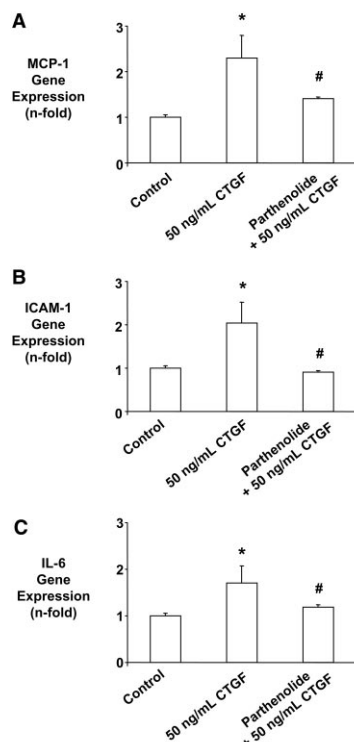


**Figure 8.** CTGF, via MAPK and NF- $\kappa$ B pathways, increases proinflammatory factors in MCT. Cells were pretreated with parthenolide (NF- $\kappa$ B inhibitor  $10^{-6}$  M), SB203580 (p38 inhibitor;  $10^{-5}$  mol/L), PD98059 (ERK1/2 inhibitor;  $10^{-5}$  mol/L), and SP600125 (JNK inhibitor;  $10^{-5}$  mol/L) for 1 h and then stimulated with 10 ng/ml CTGF for 6 h. Shown are MCP-1 (A), ICAM-1 (B), and IL-6 (C) gene expression levels determined by real-time PCR and expressed as mean  $\pm$  SEM of three experiments. \* $P < 0.05$  versus control. # $P < 0.05$  versus CTGF.

cell types.<sup>16,18,19,45,46</sup> In MCTs, CTGF induced a rapid activation of ERK1/2, p38, and JNK1/2. The specific blockade of the activation of either of the three MAPKs, ERK1/2, p38, or JNK,

inhibited NF- $\kappa$ B DNA binding activity and abolished p65 nuclear translocation caused by CTGF, suggesting that in MCT cells, all MAPKs participate in the activation of NF- $\kappa$ B. However, depending on the cell type, the specific cellular responses elicited by CTGF are differentially modulated by MAPKs. In chondrocytes, cell growth is mediated by JNK,<sup>19</sup> proliferation via ERK1/2, and differentiation by p38.<sup>42</sup> In mesangial cells, ERK1/2 mediates CTGF-induced fibrosis, migration, cytoskeleton reorganization, and chemokines production.<sup>16</sup> In human tubulointerstitial cells, CTGF induces the expression of integrin-linked kinase via ERK1/2 activation.<sup>46</sup> We have found that in MCT cells, the proinflammatory mediators, MCP-1, IL-6, and ICAM-1 induced by CTGF are controlled by NF- $\kappa$ B pathway, but different MAPKs are involved in their regulation. In this sense, MCP-1 overexpression is regulated by all three MAPKs, as described for other factors involved in renal inflammation, such as angiotensin II.<sup>47</sup> We observed that JNK activation by CTGF also regulates IL-6 overexpression, as observed in human tubulointerstitial cells in response to IL-1 $\beta$ .<sup>48</sup> *In vivo* p38 inhibition reduced renal MCP-1 levels and the severity of tissue injury but did not suppress renal levels of IL-6. By contrast, in cultured mesangial cells, p38 blockade down-regulated the production of MCP-1 and IL-6 by cytokines.<sup>49</sup> These data indicate that JNK/NF- $\kappa$ B plays a key role in IL-6 regulation in these cells. Previous studies in human tubulointerstitial and vascular cells have shown that selective inhibitors of p38 (SB203580), JNK (SP600125), and ERK (PD98059) suppressed ICAM-1 expression by cytokines.<sup>50,51</sup> In endothelial cells, p38-mediated activation of NF- $\kappa$ B and AP-1, resulted in increased expression of ICAM-1.<sup>52</sup> In response to CTGF stimulation in murine tubulointerstitial cells, ICAM-1 is up-regulated by both p38 and JNK activation. Our data suggest that multiple signaling pathways are activated during CTGF-induced damage in tubulointerstitial cells, showing a complex mechanism that gives to CTGF a proinflammatory cytokine behavior.

Several studies have demonstrated that inhibition of endogenous CTGF is beneficial for the treatment of fibrotic diseases. In nephrectomized TGF- $\beta$ 1 transgenic mice, CTGF inhibition, using antisense oligodeoxynucleotides, diminished renal interstitial fibrogenesis.<sup>53</sup> In a model of diabetic nephropathy in mice, treatment with CTGF antisense oligonucleotides reduced renal CTGF, ECM, and proteinase inhibitor mRNA expression.<sup>9</sup> In a model of liver fibrosis, intraportal vein CTGF small inter-



**Figure 9.** CTGF increases proinflammatory factors in HK-2 cell line. Cells were pretreated with parthenolide (NF- $\kappa$ B inhibitor  $10^{-6}$  M) for 1 h and then stimulated with 50 ng/ml CTGF for 6 h. Shown are MCP-1 (A), ICAM-1 (B), and IL-6 (C) gene expression levels determined by real-time PCR and expressed as mean  $\pm$  SEM of five experiments. \* $P < 0.05$  versus control. # $P < 0.05$  versus CTGF.

fering RNA (siRNA) injection reduced CTGF, type I and III collagen, and laminin mRNA levels, attenuating liver fibrosis by reducing ECM accumulation.<sup>54</sup> In human diabetic nephropathy, plasma CTGF contributes to predict the progression to end-stage renal disease in patients with type 1 diabetic nephropathy, suggesting that CTGF could be considered as a risk marker of diabetic renal and vascular disease.<sup>55–57</sup> Studies in patients with IgA nephropathy showed that expression of CTGF and TGF- $\beta$  mRNA in tubulointerstitial cells were correlated with the degree of tubulointerstitial damage.<sup>58</sup> Moreover, studies in patients with chronic cardiac damage suggest that plasma CTGF levels can be used as a marker of cardiac dysfunction and myocardial fibrosis.<sup>59</sup>

The data presented in this work exhibit that CTGF, in addition to its well-known profibrotic effects, promote renal in-

terstitial inflammation increasing renal resident cell activation, inflammatory cell infiltration, and cytokines and chemokines overexpression. Our data show for the first time that CTGF participates in the inflammatory process *in vivo* and support the idea that CTGF could be an interesting therapeutic target to reduce renal damage.

## CONCISE METHODS

### Antibodies and Reagents

We purchased culture reagents from Life Technologies BRL (Paisley, Scotland, UK), and recombinant human CTGF (endotoxin level is  $<0.1$  ng/ $\mu$ g CTGF) from MBL International Corporation (Woburn, MA). We obtained recombinant TNF- $\alpha$  from Peprotech (London, UK), and NF- $\kappa$ B consensus oligonucleotide from Promega (Madison, WI).

We used the following inhibitors: PD98059 (ERK1/2 inhibitor), SB203580 (p38 MAPK inhibitor), and SP600125, (JNK-1,-2,-3 inhibitor) from Stressgen Bioreagents Corp. (Victoria, B.C., Canada); and parthenolide (NF- $\kappa$ B inhibitor) from Calbiochem (EMD Chemical, San Diego, CA).

### Cell Cultured Studies

MCT cells are a well-characterized line of murine proximal tubular epithelial cells.<sup>60</sup> Cells were counted, seeded, and grown in RPMI 1640 medium (Life Technologies, Grand Island, NY), supplemented with 100 U/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin, and 2 mM glutamine in the presence of 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS). We then cultured the cells at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. At confluence, cells were made quiescent for 24 h, and then different studies were performed.

We grew HK-2 cells in RPMI 1640 medium with 10% of heat-inactivated FBS, 100 U/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin, and 2 mM glutamine, 5  $\mu$ g/ml ITS (Insulin Transferrin Selenium) (Sigma, St. Louis, MO) and 36 ng/ml hydrocortisone (Sigma) at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. At confluence, cells were serum-deprived for 24 h, and then experiments were done.

### In Vivo Studies

We performed studies in adult male C57Bl/6 mice (9 to 12 wk old, 20 g; Harlan Interfauna Ibérica, S.A., Barcelona, Spain). All of the procedures on animals were performed according to the International and Institutional Animal Research Committee guidelines.

Mice received 3.5 mg/g body weight parthenolide (NF- $\kappa$ B inhibitor) or its vehicle (0.05% DMSO) 24 h before 2.5 ng/g body weight CTGF or saline by intraperitoneal administration. We randomized treatment and control groups ( $n = 7$ ) as follows: (i) parthenolide followed by CTGF; (ii) vehicle (DMSO) followed by CTGF; (iii) parthenolide followed by saline; (iv) vehicle (DMSO) followed by saline; and (v) saline followed by CTGF. We calculated the dose of CTGF according to *in vitro* experiments. The dose of parthenolide was established based on previous experience in the lab.<sup>22,27</sup>

We perfused the kidneys *in situ* with cold saline before removal. One kidney from each mouse was fixed in buffered formalin, embed-

ded in paraffin, and used for immunohistochemistry. The other kidney was snap-frozen in liquid nitrogen for gene and protein studies. We collected blood samples to analyze urea and creatinine plasma levels. We also collected urine to evaluate proteinuria and creatinine.

#### Gene Expression Studies

For mRNA isolation, we pulverized frozen kidney pieces in a metallic chamber and dissolved them in 1 ml Trizol (Invitrogen, San Diego, CA). We also isolated total RNA from cultured cells with Trizol. We synthesized cDNA utilizing the High Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) using 2  $\mu$ g total RNA primed with random hexamer primers following the manufacturer's instructions.

We performed real-time RT-PCR using fluorogenic TaqMan MGB probes and primers designed by Assay-on-Demand gene expression products (Applied Biosystems): mouse MCP-1 Mm00441242\_m1, mouse RANTES Mm01302428\_m1, mouse IL-6 Mm00446190\_m1, mouse ICAM-1 Mm00516023\_m1, human IL-6 Hs\_00174131\_m1, human MCP-1 Hs\_00234140\_m1, and human ICAM-1 Hs\_00164932\_m1. We normalized data with murine glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and 18s eukaryotic ribosomal RNA expression (assay IDs: Mm99999915\_g1 and Hs99999901\_m1, respectively), and we calculated the mRNA copy numbers for each sample by the instrument software using cycle threshold (Ct) value ("arithmetic fit point analysis for the lightcycler"). We expressed results in copy numbers, calculated relative to unstimulated cells or control mice, after normalization against GAPDH and 18s, as described previously.<sup>22</sup>

#### EMSA: NF- $\kappa$ B Activation

For protein extraction from tissues, we pulverized frozen kidney pieces and resuspended them in a cold extraction buffer [20 mmol/L HEPES-NaOH, pH 7.6, 20% (vol/vol) glycerol, 0.35 mol/L NaCl, 5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mmol/L EDTA], 1 mmol/L dithiothreitol (DTT), 0.5 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)]. The homogenate was shaken for 30 min and then centrifuged at 40,000  $\times$  g for 30 min at 4°C. For nuclear protein extraction from cultured cells, they were homogenized using extraction buffer (10 mmol/L HEPES, pH 7.8, 15 mmol/L KCl, 2 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L PMSF). We separated nuclei and cytosolic fractions by centrifugation at 1000  $\times$  g for 10 min. We then resuspended the nuclei in extraction buffer to a final concentration of 0.39 mol/L KCl, followed by centrifugation at 100,000  $\times$  g for 30 min. We dialyzed the supernatants overnight against a binding buffer containing 20 mmol/L HEPES-NaOH, pH 7.6, 20% (vol/vol) glycerol, 0.1 mmol/L NaCl, 5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, and 0.5 mmol/L PMSF. We then centrifuged the dialysates at 10,000  $\times$  g for 15 min at 4°C and collected the supernatants. We quantified protein concentration by the BCA method (Pierce, Rockford, IL).

We evaluated NF- $\kappa$ B activity by binding 30  $\mu$ g tissue nuclear extracts or 10  $\mu$ g cell nuclear extracts<sup>22</sup> to a NF- $\kappa$ B consensus oligonucleotide (5'-AGTTGAGGGGACTTCCAGGC-3') <sup>32</sup>P-end-labeled by incubation for 10 min at 37°C with 10 U T4 polynucleotide kinase (Promega). The reaction was stopped by the addition of EDTA to a final concentration of 0.05 M. We equilibrated nuclear protein for 10 min in a binding buffer containing 4% glycerol, 1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L DTT, 50 mmol/L NaCl, 10 mmol/L

Tris-HCl, pH 7.5, and 50  $\mu$ l/ml poly(dI-dC) (Pharmacia, Uppsala, Sweden). We used HeLa cell nuclear extract as a known positive control because it contains NF- $\kappa$ B (not shown). To assess the specificity of the reaction, we performed the following controls: negative assay without cellular extracts; and competition assays with a 100-fold excess of unlabeled NF- $\kappa$ B, mutant NF- $\kappa$ B, and nonspecific oligonucleotides. For competition assays, we added the unlabeled probe 20 min before the addition of the labeled probe. We added 0.35 pmol labeled probe to the reaction, followed by incubation for 20 min at room temperature. The reaction was stopped by adding gel loading buffer (250 mM Tris-HCl, 0.2% bromophenol blue, 0.2% xylene cyanol, and 40% glycerol) and run on a nondenaturing, 4% acrylamide gel at 150 V at room temperature in 0.25% Tris-borate EDTA. We then dried the gel and exposed it to x-ray film.

#### Protein Studies

We quantified protein levels by western blot analysis. Cytosolic extracts from cultured cells were obtained by homogenization and centrifugation as described previously.<sup>22</sup> Then, samples were separated by SDS-PAGE, transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Millipore, Bedford, MA), blocked in PBS containing 0.1% Tween-20, 7.5% dry skimmed milk for 1 h at room temperature, and incubated in the same buffer with different primary antibodies overnight at 4°C. We used the following antibodies: phosphorylated I- $\kappa$ B $\alpha$ , I- $\kappa$ B $\beta$ , lamin b, phospho-ERK1/2, ERK1/2, phospho-p38, p38, JNK1/2 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); and phospho-JNK1/2 (Stressgen Bioreagents Corp). After washing, we incubated the membranes with peroxidase-conjugated secondary antibody and developed them using an ECL chemiluminescence kit (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). We quantified proteins in all samples using the BCA method, and we loaded 50  $\mu$ g protein in each lane. The quality of proteins and efficacy of protein transfer were evaluated by Red Ponceau staining (not shown). To evaluate equal loading, we stained the membranes with anti- $\alpha$ -tubulin antibody (Sigma), and we used the total MAPK protein levels in MAPK phosphorylation studies. We scanned the autoradiographs using the GS-800 Calibrated Densitometer (Quantity One; Bio-Rad, Madrid, Spain).

We assayed IL-10, IL-6, IL-4, and IFN- $\gamma$  protein levels by an ELISA kit from BD Bioscience (Erembodegem, Belgium) and IL-17 from eBioscience (San Diego, CA). We analyzed cytokine levels in tissue total protein extracts in lysis buffer (50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 2 mmol/L EDTA, 2 mmol/L EGTA, 0.2% Triton X-100, 0.3% IGEPAL, 10  $\mu$ l/ml proteinase inhibitors cocktail, 10  $\mu$ l/ml PMSF, and 10  $\mu$ l/ml orthovanadate), following the manufacturer's instructions. We expressed data as *n*-fold increase over the mean of control mice levels.

#### Immunofluorescence Staining of NF- $\kappa$ B Subunits

To determine which NF- $\kappa$ B subunits were activated by CTGF, we seeded cells in 24-well plates over glass coverslips. After a 24-h serum starvation step, we pretreated the cells with inhibitors and stimulated with CTGF, fixed in Merckofix (Merck, Whitehouse Station, NJ), treated with 0.1% Triton-X100, blocked with 4% BSA in 1  $\times$  PBS, and incubated with primary antibodies against p50 and p65 subunits

BASIC RESEARCH | www.jasn.org

overnight. After washing, we incubated the cells with FITC secondary antibody, and we stained the nuclei with 1  $\mu$ g/ml propidium iodide. The absence of primary antibody was the negative control. We mounted samples in Mowiol 40 to 68 (Sigma) and examined them by a laser scanning confocal microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).<sup>2</sup>

#### Transfection, DNA Constructs, and Promoter Studies

We transiently transfected MCT cells cultured in 6-well plates with FuGENE (Roche Molecular Biochemicals) and 1  $\mu$ g NF- $\kappa$ B/luc promoter and 1  $\mu$ g TK renilla as internal control. After a 24 h serum starvation step, we stimulated cells for 24 h and then evaluated the luciferase/renilla activity with Promega kits.<sup>21</sup>

#### Renal Histology and Immunohistochemistry

We stained the paraffin embedded kidney sections using standard histology procedures, including Masson Trichrome. Immunostaining was carried out in 4- $\mu$ m-thick tissue sections that were deparaffinized through xylene and hydrated through graded ethanol (100%, 96%, 90%, and 70%) and distilled water. Endogenous peroxidase was blocked. We incubated the tissue sections with trypsin for 30 min at 37°C and then for 1 h at room temperature with 4% BSA and serum in 1  $\times$  PBS to eliminate nonspecific protein binding sites. We incubated primary antibodies to detect MCP-1 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), RANTES (Chemicon International, Millipore), CD3, and CD68 (Serotec, Oxford, UK) overnight at 4°C. After washing, we treated the slides with the corresponding anti-IgG biotinylated-conjugated secondary antibody (Amersham Bioscience, Buckinghamshire, England) followed by the avidin-biotin-peroxidase complex (Dako, Dako Diagnósticos S.A., Barcelona, Spain), and 3,3'-diaminobenzidine as chromogen. We counterstained the sections with Carazzi's hematoxylin. We performed negative controls by incubation with a nonspecific Ig of the same isotype as the primary antibody and without primary antibody. Quantification of CD68-stained and CD3 stained cells was made by determining the total number of positive cells in 20 randomly chosen fields ( $\sim$ 400) using Image-Pro Plus software (Media Cybernetics, Bethesda, MD). We expressed data as positive stained area versus total analyzed area. We examined samples from each animal in a blind manner.

#### Statistical Analysis

We expressed results as mean  $\pm$  SEM fold change over control. We used one-way ANOVA to compare gene and/or protein expression levels between groups. When statistical significance was found, we used the Bonferroni *post hoc* comparison test to identify differences between groups. We considered differences significant at  $P < 0.05$ . Statistical analyses were performed using the SPSS statistical software, version 11.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work has been supported by grants from Ministerio de Educación y Ciencia (SAF 2005–03378), Sociedad Española de Nefrología, FIS (PI020822 and PI081564), Red temática de Investigación Renal,

REDINREN (ISCIII-RETIC RD06/0016) from the Instituto de Salud Carlos III from Ministerio de Sanidad y Consumo, the EU project DIALOK: LSMB-CT-2007–036644, PCI Iberoamerica (A/9571/07), and FONDECYT, Chile (1080083). Programa Intensificación Actividad Investigadora (ISCIII/Agencia Lain Entralgo/CM) to A.O. We want to thank M<sup>a</sup> Mar Gonzalez Garcia-Parreño for her technical help.

#### DISCLOSURES

None.

#### REFERENCES

1. Lou LF, Lom SC: The CCN family of angiogenic regulators: The integrin connection. *Exp Cell Res* 243: 44–57, 1999
2. Gupta S, Clarkson MR, Duggan J, Brady HR: Connective tissue growth factor: Potential role in glomerular sclerosis and tubulointerstitial fibrosis. *Kidney Int* 59: 1309–1399, 2000
3. Rupérez M, Ruiz-Ortega M, Esteban V, Lorenzo O, Mezzano S, Plaza JJ, Egido J: Angiotensin II increases connective tissue growth factor in the kidney. *Am J Pathol* 163: 1937–1947, 2003
4. Riser BL, Denichilo M, Cortes P, Baker C, Giordano JM, Yee J, Narins RO: Regulation of connective tissue growth factor activity in cultured rat mesangial cells and its expression in experimental diabetic glomerular sclerosis. *J Am Soc Nephrol* 11: 25–38, 2000
5. Burns WC, Twigg SM, Forbes JM, Peto J, Tekle C, Thallos-Bonko V, Thomas MC, Cooper ME, Kanteridis P: Connective tissue growth factor plays an important role in advanced glycation end product-induced tubular epithelial-to-mesenchymal transition: Implications for diabetic renal disease. *J Am Soc Nephrol* 17: 2434–2494, 2006
6. Yokoi F, Mukoyama M, Sugawara A, Mori K, Nagao T, Makino H, Suganami T, Yahata K, Fujinaga Y, Tanaka I, Nakao K: Role of connective tissue growth factor in fibronectin expression and tubulointerstitial fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 282: F933–F942, 2002
7. Zhang C, Meng X, Zhu Z, Yang X, Deng A: Role of connective tissue growth factor in renal tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation and extracellular matrix accumulation in vitro. *Life Sci* 75: 367–379, 2004
8. Sánchez-López E, Rodríguez-Vita J, Cartier C, Rupérez M, Esteban V, Carvajal G, Rodríguez-Diez R, Plaza JJ, Egido J, Ruiz-Ortega M: Inhibitory effect of interleukin-1beta on angiotensin II-induced connective tissue growth factor and type IV collagen production in cultured mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 294: F149–F160, 2008
9. Guha M, Xu ZG, Lung D, Lanting L, Natarajan R: Specific down-regulation of connective tissue growth factor attenuates progression of nephropathy in mouse models of type 1 and type 2 diabetes. *FASEB J* 21: 2255–2266, 2007
10. Chen J, Liu BC, Zhang XL, Zhang J, Li H, Li MX: Influence of connective tissue growth factor antisense oligonucleotide on angiotensin II-induced epithelial mesenchymal transition in HK2 cells. *Acta Pharmacologica Sinica* 27: 1029–1036, 2007
11. Szeto CC, Chow KM, Lai KD, Szeto CY, Kwan BC, Li PK: Connective tissue growth factor is responsible for transforming growth factor-beta-induced peritoneal mesothelial cell apoptosis. *Nephron Exp Nephrol* 103: e166–e174, 2006
12. Gao R, Briggslock DR: Activation of nuclear factor kappa B (NF-kappaB) by connective tissue growth factor (CCN2) is involved in sustaining the survival of primary rat hepatic stellate cells. *Cell Commun Signal* 3: 14, 2005



13. Chien W, Yin D, Gui D, Mori A, Frank JM, Seic J, Kusumoto D, Marchevsky A, McKenna R, Koeffler HP: Suppression of cell proliferation and signaling transduction by connective tissue growth factor in non-small cell lung cancer cells. *Mol Cancer Res* 4: 591–598, 2006
14. Aikawa T, Gunn J, Soong SM, Klaus SJ, Kozl M: Connective tissue growth factor-specific antibody attenuates tumor growth, metastasis, and angiogenesis in an orthotopic mouse model of pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther* 11C8–1116, 2006
15. Ciana J, Yilmaz A, Klein M, Raithe D, Brigstock DR, Daniel WG, Goppelt-Strube M, Garlisch CD: Connective tissue growth factor is overexpressed in complicated atherosclerotic plaques and induces mononuclear cell chemotaxis in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 1008–1013, 2005
16. Crean JKG, Hinley D, Murphy M, Moss C, Godson C, Martin F, Brady HR: The role of p42/p44 MAPK and protein kinase B in connective tissue growth factor-induced extracellular matrix protein production, cell migration, and actin cytoskeletal rearrangement in human mesangial cells. *J Biol Chem* 277: 44187–44194, 2002
17. Wu SH, Wu XH, Lu C, Dong L, Zhou GP, Chen ZQ: Lipoxin A<sub>4</sub> inhibits connective tissue growth factor-induced production of chemokines in rat mesangial cells. *Kidney Int* 69: 248–256, 2006
18. Wahab NA, Weston BS, Mason RM: Connective tissue growth factor (CCN2) interacts with and activates the tyrosine kinase receptor TrkA. *J Am Soc Nephrol* 16: 340–351, 2005
19. Yoshimichi G, Kubota S, Nishida T, Kondo S, Yaginuma T, Nakao K, Takano-Yamamoto T, Takigawa M: Roles of PKC, PI3K and JNK in multiple transduction of CCN2/CTGF signals in chondrocytes. *Bone* 38: 958–963, 2006
20. Gujjarro C, Egido J: Transcription factor kappa B (NF kappa B) and renal disease. *Kidney Int* 59: 415–424, 2001
21. Barnes PJ, Karin M: Nuclear factor-kappaB: A pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 336: 1066–1071, 1997
22. Esteban V, Lorenzo O, Rupérez M, Suzuki Y, Mezzano S, Blanco J, Kretzschmar M, Sugaya T, Egido J, Ruiz-Ortega M: Angiotensin II, via AT1 and AT2 receptors and NF kappaB pathway, regulates the inflammatory response in unilateral ureteral obstruction. *J Am Soc Nephrol* 15: 1514–1529, 2004
23. Tomita N, Morishita R, Imai HY, Yamamoto K, Hashizume M, Nishike M, Toyosawa K, Fujitani R, Mi W, Nikolic-Patorson DJ, Atkins RC, Kaneda Y, Higaki J, Ogihara T: In vivo administration of a nuclear transcription factor kappaB decoy suppresses experimental crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 11: 1244–1252, 2000
24. Mezzano SA, Barria M, Droguett MA, Burgos ME, Ardiles LC, Flores C, Egido J: Tubular NF-kB and AP-1 activation in human proteinuric renal disease. *Kidney Int* 60: 1366–1377, 2001
25. Mezzano S, Arco C, Droguett A, Burgos ME, Ardiles L, Flores C, Schneider H, Ruiz-Ortega M, Egido J: NF-kappaB activation and overexpression of regulated genes in human diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 19: 2505–2512, 2004
26. Hehner SP, Hofmann TG, Droge W, Schmitz W: The antiinflammatory sesquiterpene lactone parthenolide inhibits NF-kappa B by targeting the I kappa B kinase complex. *J Immunol* 163: 5617–5623, 1999
27. Lopez-Farrar CO, Suzuki Y, Sanjuan G, Blanco J, Hernandez-Vargas P, Ye Y, Kopp J, Egido J, Gomez-Guerrero C: Nuclear factor kappa B inhibitors as potential novel anti-inflammatory agents for the treatment of immune glomerulonephritis. *Am J Pathol* 161: 1497–1505, 2002
28. van Kooten C, Daha MR, van Es LA: Tubular epithelial cells: A critical cell type in the regulation of renal inflammatory processes. *Exp Nephrol* 7: 429–437, 1999
29. Karger A, Fritzer D, Brock P, Spormann G, Emmrich J, Liebe S, Master R: Molecular insights into connective tissue growth factor action in rat pancreatic stellate cells. *Cell Signal* 20: 1865–1872, 2008
30. Ruster C, Weigert G: The role of chemokines and chemokine receptors in diabetic nephropathy. *Front Biosci* 13: 944–955, 2008
31. Lloyd CM, Doré ME, Proudfoot A, Salant DJ, Gutierrez Ramires C: Role of MCP-1 and RANTES in inflammation and progression to fibrosis during murine crescentic nephritis. *J Leukoc Biol* 62: 676–680, 1997
32. Uhm WS, Na K, Song CW, Jung SS, Lee T, Park MH, Yoo DH: Cytokine balance in kidney tissue from IgA nephritis patients. *Rheumatology (Oxford)* 42: 935–938, 2003
33. Rice EK, Nikolic-Patorson DJ, Hill PA, Metz CN, Bucala R, Atkins RC, Tesch GH: Interferon-gamma induces macrophage migration inhibitory factor synthesis and secretion by tubular epithelial cells. *Nephrolology (Carlton)* 6: 156–161, 2003
34. Carvalho-Pinto CE, Garcia M, Mollado M, Rodriguez-Fracedo JV, Martín Caballero J, Flores J, Martínez A C, Salomons D: Autocrine production of IFN-gamma by macrophages controls their recruitment to kidney and the development of glomerulonephritis in MRL/lpr mice. *J Immunol* 169: 1053–1067, 2002
35. Fukutsu A, Matsuo S, Yagawa Y, Miyai H, Futema A, Kato K: Expression of interleukin 6 and major histocompatibility complex molecules in tubular epithelial cells of diseased human kidneys. *Lab Invest* 69: 58–67, 1993
36. Herrera-España R, Barbosa-Cisneros O, Villalobos-Fuente R, Avalos-Díaz E: Renal expression of IL-6 and TNFalpha genes in lupus nephritis. *Lupus* 7: 154–156, 1998
37. Patel NS, Chatterjee PK, Di Paolo R, Mazzoni F, Brilli D, De Sarro A, Cuzzocrea S, Thiemermann C: Endogenous interleukin-6 enhances the renal injury, dysfunction, and inflammation caused by ischemia/reperfusion. *J Pharmacol Exp Ther* 312: 1170–1176, 2005
38. Sommer M, Eismann U, Gierth U, Stein G: Interleukin-6 co-stimulates the PDGF-BB- and bFGF-mediated proliferation of mesangial cells and myofibroblasts. *Nephron* 92: 868–880, 2002
39. Deckers JG, De Zeeuw D, van der Woude FJ, van der Kooij SW, Daha MR, van Kooten C: IL-4 and IL-13 augment cytokine- and CD40-induced RANTES production by human renal tubular epithelial cells in vitro. *J Am Soc Nephrol* 9: 1137–1193, 1999
40. Mu W, Ouyang X, Agarwal A, Zhang L, Long DA, Cruz PF, Ramezani CA, Glushakova OY, Chiodo VA, Atkinson MA, Hauswirth WW, Floege TR, Rodriguez-Iturbe B, Johnson RJ: IL-10 suppresses chemokines, inflammation, and fibrosis in a model of chronic renal disease. *J Am Soc Nephrol* 16: 3651–3660, 2005
41. Kitching AR, Tipping PG, Timoshenko R, Holdsworth SR: Frangeneous interleukin-10 regulates Th1 responses that induce crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int* 57: 518–525, 2000
42. Kingston HG, Mills: Induction, function and regulation of IL 17 producing T cells. *Eur J Immunol* 38: 2636–2649, 2008
43. Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, Maggi E, Romagnani S: The phenotype of human Th17 cells and their precursors, the cytokines that mediate their differentiation and the role of Th17 cells in inflammation. *Int Immunol* 20: 1361–1368, 2008
44. Vanden Berghe W, Plaisance S, Boone E, De Bosscher K, Schmitz ML, Hers W, Haegeman G: p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways are required for nuclear factor-kappaB p65 transactivation mediated by tumor necrosis factor. *J Biol Chem* 273: 3285–3290, 1998
45. Yoshimichi G, Nakanishi T, Nishida T, Hattori T, Takano-Yamamoto T, Takigawa M: CTGF/Hs24 induces chondrocyte differentiation through a p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK), and proliferation through a p44/42 MAPK/extracellular-signal regulated kinase (ERK). *Eur J Biochem* 265: 6058–6065, 2001
46. Liu XC, Liu BC, Zhong XL, Li MX, Zhang J: Role of ERK1/2 and p38-K in the regulation of CTGF induced ILK expression in HK 2 cells. *Chin Chim Acta* 382: 89–94, 2007
47. Tanifuji C, Suzuki Y, Geot WM, Horikoshi S, Sugaya T, Ruiz-Ortega M, Egido J, Tomino Y: Reactive oxygen species-mediated signaling pathways in angiotensin II-induced MCP-1 expression of proximal tubular cells. *Antioxid Redox Signal* 7: 1261–1268, 2005
48. de Haai S, Barker AC, van der Gees RN, Haegeman G, Vanden Berghe W, Aarbiou J, Daha MR, van Kooten C: NF-kappaB mediated

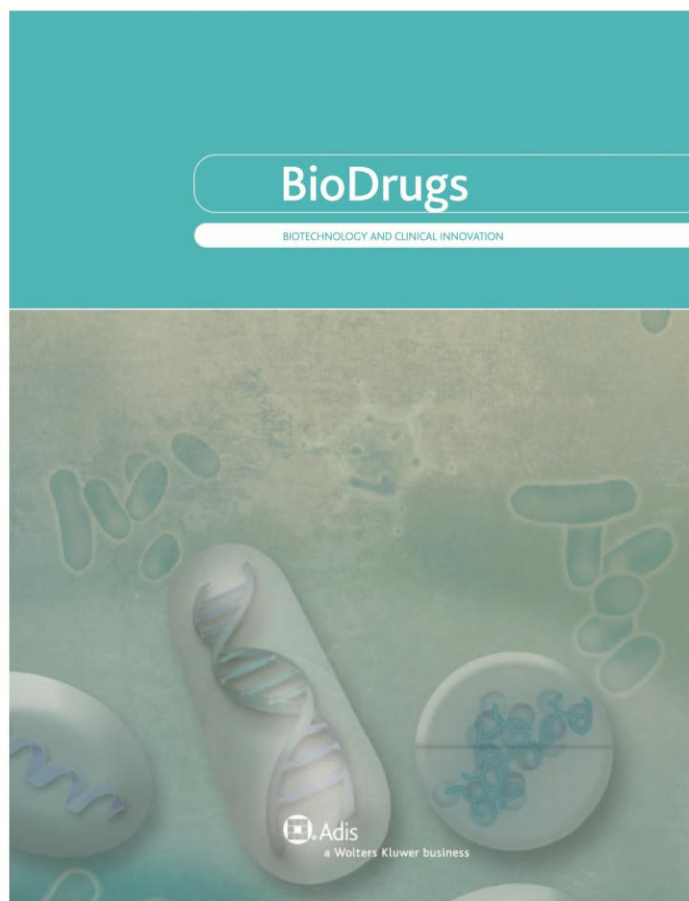
- IL-6 production by renal epithelial cells is regulated by c-Jun N-terminal kinase. *J Am Soc Nephrol* 16: 1605–1611, 2005
49. Sheryanna A, Bhargal G, McDaid J, Smith J, Manning A, Foxwell BM, Felamen M, Cook JT, Pusey CD, Tem FW: Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase is effective in the treatment of experimental crescentic glomerulonephritis and suppresses monocyte chemoattractant protein-1 but not IL-1beta or IL-6. *J Am Soc Nephrol* 18: 1167–1179, 2007
50. Ho AW, Wong CK, Lam CW: Tumor necrosis factor- $\alpha$  up-regulates the expression of CCL2 and adhesion molecules of human proximal tubular epithelial cells through MAPK signaling pathways. *Immunobiology* 213: 533–544, 2008
51. Lin WN, Luo SF, Lee CW, Wang CC, Wang JS, Yang CM: Involvement of MAPKs and NF- $\kappa$ B in LPS-induced VCAM-1 expression in human tracheal smooth muscle cells. *Cell Signal* 19: 1258–1267, 2007
52. Ueno H, Pradhan S, Schlessel D, Hirasawa H, Sumpio BF: Nicotine enhances human vascular endothelial cell expression of CAM-1 and VCAM-1 via protein kinase C, p38 mitogen activated protein kinase, NF- $\kappa$ B, and AP-1. *Cardiovasc Toxicol* 6: 39–50, 2006
53. Okada H, Kiwata T, Kobayashi T, Inoue T, Karno Y, Takigawa M, Sugaya T, Kopp JB, Suzuki H: Connective tissue growth factor expressed in tubular epithelium plays a pivotal role in renal fibrogenesis. *J Am Soc Nephrol* 16: 133–143, 2005
54. Li GM, Li DG, Xie Q, Shi Y, Jiang S, Zhou HJ, Lu HM, Lin YX: Effect of silencing connective tissue growth factor on rat liver fibrosis and the accumulation of extracellular matrix. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 16: 138–142, 2006
55. Jaffa AA, Lisinger WR, McHenry MB, Jaffa MA, Lipitz SR, Lackland D, Lopes-Virela M, Luttrell LM, Wilson PW: The Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (DCCT/EDIC) Study Group. Connective tissue growth factor and susceptibility to renal and vascular disease risk in type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 93: 1993–1999, 2006
56. Thomson SC, McLennan SV, Krwan PD, Heffernan SJ, Hennessy A, Yue DK, Twigg SM: Renal connective tissue growth factor correlates with glomerular basement membrane thickness and prospective albuminuria in a non-human primate model of diabetes: Possible predictive marker for incipient diabetic nephropathy. *J Diabetes Complications* 22: 284–294, 2008
57. Nguyen TQ, Tarnow L, Jorsal A, Oliver N, Roestenberg P, Ito Y, Parving HH, Rossing P, von Nieuwenhoven FA, Goldschmeding R: Plasma connective tissue growth factor is an independent predictor of end-stage renal disease and mortality in type 1 diabetic nephropathy. *Diabetes Care* 31: 6177–6214, 2008
58. Nonaka Takahashi S, Fujita T, Takahashi T, Wada Y, Fuke Y, Satomura A, Matsumoto K: TGF- $\beta$ 1 and CTGF mRNAs are correlated with urinary protein level in IgA nephropathy. *J Nephrol* 21: 53–63, 2008
59. Koizumi N, Arai M, Niwano K, Watanabe A, Endoh M, Sugita M, Yokoyama T, Tada H, Toyama T, Adachi H, Naito S, Oshima S, Nishida T, Kubota S, Takigawa M, Kurabayashi M: Plasma connective tissue growth factor is a novel potential biomarker of cardiac dysfunction in patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail* 10: 373–379, 2008
60. Stritz F, Okada H, Ito CW, Danoff T, Carone RI, Tomaszewski JF, Neilson EG: Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *J Cell Biol* 130: 395–405, 1995
61. Esteban V, Rupe sz M, Sánchez-López E, Rodríguez-Vita J, Lorenzo O, Demaegdt J, Vanderheyden P, Egido J, Ruiz-Ortega A: Angiotensin IV activates the nuclear transcription factor- $\kappa$ B and related proinflammatory genes in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 96: 965–973, 2005



**Adis**

a Wolters Kluwer business

**This material is the copyright of the original publisher.  
Unauthorised copying and distribution is prohibited.**



#### **Terms and Conditions for Use of PDF**

The provision of PDFs for authors' personal use is subject to the following Terms & Conditions:

The PDF provided is protected by copyright. All rights not specifically granted in these Terms & Conditions are expressly reserved. Printing and storage is for scholarly research and educational and personal use. Any copyright or other notices or disclaimers must not be removed, obscured or modified. The PDF may not be posted on an open-access website (including personal and university sites).

The PDF may be used as follows:

- to make copies of the article for your own personal use, including for your own classroom teaching use (this includes posting on a closed website for exclusive use by course students);
- to make copies and distribute copies (including through e-mail) of the article to research colleagues, for the personal use by such colleagues (but not commercially or systematically, e.g. via an e-mail list or list serve);
- to present the article at a meeting or conference and to distribute copies of such paper or article to the delegates attending the meeting;
- to include the article in full or in part in a thesis or dissertation (provided that this is not to be published commercially).

# Carbosilane Dendrimers to Transfect Human Astrocytes with Small Interfering RNA Targeting Human Immunodeficiency Virus

Jose Luis Jiménez,<sup>1,2\*</sup> María Isabel Clemente,<sup>2,3\*</sup> Nick D. Weber,<sup>2,3</sup> Javier Sanchez,<sup>1</sup> Paula Ortega,<sup>2,4</sup> F. Javier de la Mata,<sup>2,4</sup> Rafael Gómez,<sup>2,4</sup> Dolores García,<sup>2,3</sup> Luis A. López-Fernández<sup>2,5</sup> and María Ángeles Muñoz-Fernández<sup>2,3</sup>

- 1 Plataforma de Laboratorio, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, C/Doctor Esquerdo 46, Madrid, Spain
- 2 CIBER de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), Instituto de Salud Carlos III, Spain
- 3 Laboratorio de Inmunobiología Molecular, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, C/Doctor Esquerdo 46, Madrid, Spain
- 4 Departamento de Química Inorgánica, Universidad de Alcalá, Campus Universitario, Edificio de Farmacia, Alcalá de Henares, Spain
- 5 Laboratorio de Farmacogenética y Farmacogenómica, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, C/Doctor Esquerdo 46, Madrid, Spain

## Abstract

**Background:** HIV infection of the CNS is the principle cause of HIV-associated dementia in adults and encephalopathy in children. Gene therapy techniques such as small interfering RNA (siRNA) possess great potential in drug development, but first they must overcome the key obstacle of reaching the interior of the affected cells. A successful delivery vector for anti-HIV drugs that is capable of crossing the blood-brain barrier (BBB) could provide a way of addressing this issue. Non-viral vectors such as dendrimers offer a means for effectively delivering and transfecting siRNA to the target cells.

**Objective:** To evaluate the application of gene therapy for reducing HIV replication in human astrocytes.

**Methods:** We used the 2G-NN16 amino-terminated carbosilane dendrimer as a method for delivering siRNA to HIV-infected human astrocytes. We tested the cytotoxicity in human astrocytoma cells caused by 2G-NN16 and dendriplexes formed with siRNA (siRNA/2G-NN16) by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromide (MTT) and lactate dehydrogenase assays. The ability to transfect human astrocytes with siRNA/2G-NN16 dendriplexes was tested by flow cytometry and immunofluorescence microscopy. To assess the potential capability of siRNA/2G-NN16 dendriplexes for crossing the BBB, we used an *in vitro* transcytosis assay with bovine brain microvascular endothelial cells. HIV-1 inhibition assays using 2G-NN16 and siRNA/2G-NN16 dendriplexes were determined by quantification of the viral load from culture supernatants of the astrocytes.

**Results:** A gradual time-controlled degradation of the 2G-NN16 dendrimer and liberation of its siRNA cargo between 12 and 24 hours was observed via gel electrophoresis. There was no cytotoxicity in HIV-infected or non-infected human astrocytoma cells when treated with up to 24 µg/mL of 2G-NN16 dendrimer or siRNA/2G-NN16 dendriplexes, and siRNA/2G-NN16 dendriplexes were seen to successfully transfect human astrocytes even after crossing an *in vitro* BBB model. More interestingly, transfected siRNA was observed to exert a biologic effect, as dendriplexes were shown to down-regulate the housekeeping gene *GAPDH* and to reduce replication of HIV-1 strains X4-HIV NL4-3 and R5-HIV BaL in human astrocytes.

**Conclusions:** The 2G-NN16 dendrimer successfully delivers and transfects siRNA to HIV-infected human astrocytes and achieves gene silencing without causing cytotoxicity.

\* Both authors have contributed equally to this paper.

## Introduction

HIV-1 infection is often accompanied by neurologic disorders and neuropathologic abnormalities. Approximately 10–20% of treated patients show some form of overt illness.<sup>[1,2]</sup> Minor cognitive/motor disorder (MCMD) which presents with symptoms such as cognitive and motor slowing, poor concentration, and impaired memory often occurs during early HIV infection.<sup>[3]</sup> During the late stage of the infection, a more severe form of neurologic complications collectively termed HIV-associated dementia (HAD) may develop. In 5–8% of patients, a syndrome known as AIDS mania develops in addition to HAD.<sup>[2]</sup> Moreover, HIV-infected children are particularly vulnerable to HAD.<sup>[4–6]</sup> Highly active antiretroviral therapy (HAART) is, in general, less effective for the treatment of the central nervous system (CNS) complications of AIDS than it is for other AIDS-related illnesses.<sup>[7,8]</sup> In the short term, HAART remains fairly effective against the more severe CNS illnesses such as HAD. Although the incidence of HAD has been reduced from over 30% of the AIDS population to around 10% in the post-HAART era,<sup>[9,10]</sup> this has been accompanied by a significant increase in the overall prevalence of HAD, since patients now live longer. Relapses of HAD in HAART-treated patients are also common.<sup>[11,10]</sup> The therapeutic value of HAART for other HIV-related CNS complications is lower. Clinical data indicate that since the advent of HAART, there has been a steady increase in the incidence of MCMD.<sup>[11]</sup> Studies have also shown that low-grade inflammation frequently persists in patients receiving HAART, suggesting the occurrence of ongoing immune activation in the CNS.<sup>[11,12]</sup> The severity of this issue stems from the fact that the blood-brain barrier (BBB) separates the blood from the cerebral parenchyma and prevents the penetration of drugs into the CNS. This physical barrier is characterized by tight intracellular junctions, which limit permeability for therapeutic molecules such as most antiretrovirals, especially the protease inhibitors.<sup>[13]</sup> One proposed method of therapy is the use of gene therapy as an adjunctive treatment with current antiretrovirals.

RNA interference is a gene therapy strategy for specifically targeting and down-regulating genes.<sup>[14,15]</sup> Small interfering RNA (siRNA) has been used successfully to target HIV replication *in vitro*<sup>[16–21]</sup> and *in vivo*.<sup>[22]</sup> However, a major limiting step for the success of this therapy is the effective delivery of siRNA into the target cells.<sup>[23]</sup> This issue is especially relevant for *in vivo* settings. For a therapy involving the systemic administration of siRNA to be successful, the delivery system must be stable in the bloodstream, be able to remain in circulation, be resistant to degradation by ribonucleases (RNases),

reach the target cells, transfect the cell membrane, and escape cellular endosomes to finally release its payload in the interior of the cell.<sup>[24,25]</sup> Attempts at addressing these issues through the use of current techniques for siRNA delivery *in vitro* such as cationic polymers or viral vectors have encountered problems such as cytotoxicity and immunogenicity.<sup>[26,27]</sup> There is a need for an alternative approach to siRNA delivery with the potential of overcoming these obstacles.

We have synthesized carbosilane dendrimers with peripheral ammonium groups to address the difficulties in siRNA and oligonucleotide delivery.<sup>[28]</sup> Dendrimers are nanoscopic, monodisperse, polybranched synthetic polymers. The dendriplexes formed between carbosilane dendrimers and siRNA have been previously characterized in terms of their stability, strength of union, resistance to degradation by RNase, particle size, and zeta potential.<sup>[29]</sup> Furthermore, the structural and kinetic properties allow the dendrimers to function as delivery vehicles for siRNA and improve their effect on HIV inhibition in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes.<sup>[29]</sup> In addition, dendrimers have great potential for delivery of small drugs to the CNS because they are smaller and have a lower polydispersity than other delivery vectors.<sup>[30]</sup>

Building upon the previously positive results obtained on HIV inhibition in the immune system in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, and in order to examine the potential of this nanoparticle for *in vivo* trials, additional cell types that do not express CD4 on their surface, such as those in the nervous system, need to be explored as targets for 2G-NN16/siRNA dendriplex functionality. HIV infection of nervous system cells poses serious clinical problems for HIV patients because of the extremity of neurodegenerative diseases caused by HIV. Furthermore, due to the difficulty in reaching HIV-infected cells of the CNS with antiretroviral drugs,<sup>[31]</sup> additional therapies and drug delivery vehicles are greatly needed. Thus, the objective of this research was to use dendrimers to bind and protect the siRNA while in transit to the target cells, facilitate its transfection into the cytoplasm, and release the siRNA once inside the cells. Here, we present results from the application of this gene therapy technique for reducing HIV replication in human astrocytes, as well as results on cytotoxicity and transfection in these cells and an evaluation of the transcytosis of the dendriplexes through an *in vitro* biologic barrier model.

## Materials and Methods

### Cell Cultures

Normal human astrocytes (NHA) were purchased from Lonza Walkersville, Inc. (Walkersville, MD, USA). NHA cells

were cultured by plating the cells at a density of 15 000 cells/cm<sup>2</sup> in expansion media (AGM Bullet Kit media, Cambrex). Once the cells reached about 95% confluence, they were harvested using 0.25% trypsin/1 mmol/L EDTA for 5 minutes at 37°C. The astrocytoma human cell line U87MG was routinely grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Biochrom AG, Berlin, Germany) containing 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin/streptomycin, and 2 mmol/L L-glutamine (Lonza Walkersville, Inc.). Both types of cells do not express CD4 on their surface.

#### Carbosilane Dendrimer

Carbosilane dendrimers were synthesized as previously described.<sup>[32,33]</sup> The dendrimer 2G-CBS(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sup>+</sup>Me<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sup>+</sup>Me<sub>3</sub>I<sup>-</sup>)<sub>8</sub> was used in all experiments, and will be referred to as 2G-NN16, indicating that it is a second-generation dendrimer with 16 positive charges resulting from the total quaternization of the two amines on each branch (figure 1a). At pH 7.4, the dendrimers possess 16 positive charges, as has been shown by <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance (NMR) and <sup>13</sup>C NMR spectroscopy measurements.<sup>[32]</sup>

#### Small Interfering RNA (siRNA)

All siRNA sequences have anti-HIV activity and were chosen on the basis of previously published results.<sup>[34-36]</sup> The sequences of siRNA targeted either the HIV-1 *gag* protein at the region of the *p24* protein (siP24) [sense: GAUUGUACUGAGAGACA GGCU; antisense: CCUGUCUCUCAGUACAAUCUU] or the HIV-1 *nef* protein (siNEF) [sense: UGCCUGGCUAGA AGCACAdTdT; antisense: UGUGCUUCUAGCCAGGCA CdTdT] (Dharmacon, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). siP24 labeled with either the fluorochrome Cy3 or fluorescein isothiocyanate (FITC) on the 5' end of the sense strand were utilized to detect the entrance of siRNA into cells. In siRNA functionality experiments, an siRNA of random sequence (siRandom) was used as a negative control. This siRNA was siCONTROL Non-Targeting siRNA #2, designed and screened by Dharmacon.

#### Dendriplex Formation

Dendriplexes were formed by mixing equal volumes of dendrimer and siRNA dissolved in OPTIMEM I at concentrations depending on the +/- charge ratios and molar concentrations desired. For time-controlled liberation experiments, gel electrophoresis was used to visualize the dendriplexes after

varying time periods. Immediately prior to loading the samples on 3% agarose gels, all samples were split into two aliquots of equal volume: one untreated and the other treated with heparin (2 IU/μg siRNA) to free any remaining siRNA from complexation with the dendrimer. The samples were then loaded on the gel and run at 90 V for 30 minutes. The gel bands were quantified using Quantity One 1D Analysis Software (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA).

#### Mitochondrial Metabolism and Lactate Dehydrogenase Assays

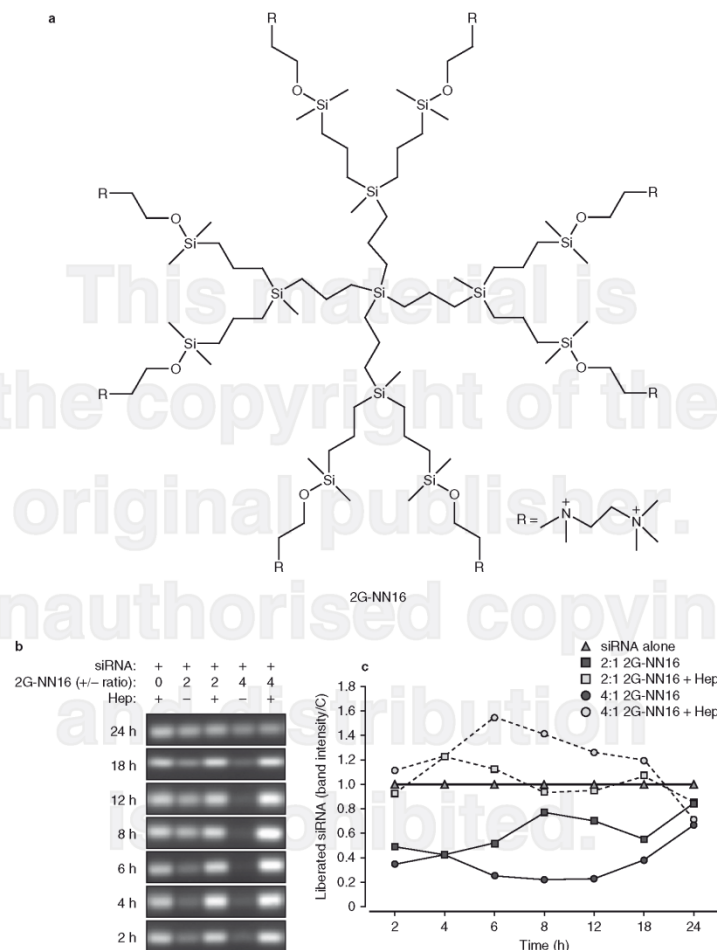
We studied cellular mitochondrial metabolism by detecting the reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromide (MTT) to indicate toxicity of either 2G-NN16 alone or bound to different siRNA at 24 and 72 hours after treatment in U87MG astrocytes.<sup>[26]</sup> In addition, we studied cell membrane rupture by detecting lactate dehydrogenase (LDH) in the supernatant of U87MG cells treated with 2G-NN16 after 3, 5, and 24 hours (CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay, Promega Corporation, Madison, WI, USA). Controls were untreated cells and cells treated with 0.1% Triton X-100.

#### Cell Proliferation

U87MG cells were seeded in 96-well plates 24 hours prior to performing the assay, in complete medium containing 2% FBS (1 × 10<sup>5</sup> cells in 100 μL/well). The following day, the serum concentration was brought up to 10% and the cells were submitted to treatment with dendriplex. After 20 hours, cell proliferation was measured by detecting the incorporation of bromodeoxyuridine in newly synthesized DNA according to kit protocol (Chemicon International, Temecula, CA, USA).

#### Flow Cytometry

Following treatment with Cy3-siP24 (500 nmol/L) or dendriplexes at varying +/- ratios, U87MG cells were analyzed by flow cytometry to determine the percentage of the viable cell population that exhibited fluorescence, representing successful transfection of the fluorochrome-labeled siRNA. We also studied the transfection intensity at 3 hours, by x-median values. Cells were washed with glycine acid (1 mmol/L, 1 minute) to remove any siRNA from the plasma membrane. The commercial cationic lipid reagent Lipofectin® (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) was used as a comparative control according to the kit transfection protocol.



**Fig. 1.** Carbosilane dendrimer structure and time-controlled liberation of small interfering RNA (siRNA). **(a)** Structure of second-generation carbosilane dendrimer (2G-NN16). **(b)** siRNA gel bands reveal released siRNA from the dendriplex. **(c)** Graphical analysis of the bands clearly shows the retention of siRNA by the dendrimer. At a +/- charge ratio of 4, 2G-NN16 retains siRNA up through 12 hours, followed by a gradual liberation. The y-axis label 'band intensity/C' indicates the band intensity of each sample at different times calculated in relation to the intensity of the control (siRNA alone) at the same time. **Hep**=heparin.

#### Immunofluorescence Microscopy

U87MG cells were seeded on coverslips in 24-well plates 24 hours prior to being treated with siRNA alone or dendriplexes at +/- ratios of 4 or 8. Three hours later, the cover-

slips were collected, rinsed, and stained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; 5 µg/mL). The coverslips were mounted on microscope slides with Dako Fluorescence Mounting Medium (Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark) and photographed with a Nikon Eclipse E800 immunofluorescence

microscope, using filters of 400–420 nm (DAPI) and 575–590 nm (Cy3).

#### Transcytosis Assays

$5 \times 10^5$  bovine brain microvascular endothelial cells (bMVEC-B)/cm<sup>2</sup> (Clonetics® Bovine Brain Microvascular Endothelial Cell System; Lonza Walkersville, Inc.) were seeded in the apical zone of the chamber, in Endothelial Basal Medium (EBM®-2), complemented with supplement and growth factors (bovine endothelial cell growth factor [bECGF], ascorbic acid, heparin, platelet poor horse serum and penicillin, streptomycin and fungizone) as EMVB SingleQuots® (Lonza Walkersville, Inc.) on a 0.4 µm pore polycarbonate permeable support coated with rat tail collagen type I (10 µg/cm<sup>2</sup>) and over-coated with fibronectin (5 µg/cm<sup>2</sup>) [all from Sigma-Aldrich, Inc., St Louis, MO, USA] prior to seeding. The transepithelial electric resistance of the monolayer was measured with an Epithelial Voltammeter (World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL, USA) prior to initiating the experiment, and only when a measurement of  $>300 \Omega\text{cm}^2$  was obtained was the barrier considered fully formed.<sup>[36,37]</sup> bMVEC-B cells, that were being grown concurrently on coverslips, were monitored with a light microscope to estimate the growth progress and confluency. It took 11 days for the cells to form a completed monolayer.<sup>[38]</sup> In the basolateral zone of the chamber,  $3 \times 10^5$  U87MG cells were cultured in DMEM containing 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin, and 2 mmol/L L-glutamine. When the bMVEC-B monolayer was formed, siP24-FITC alone or 2G-NN16/siP24-FITC dendriplexes were added to the bMVEC-B apical zone. In the basolateral zone, 5 or 72 hours later, the U87MG cells were collected and analyzed by flow cytometry as mentioned above.

#### GAPDH Silencing

U87MG cells were seeded in 6-well plates ( $3 \times 10^5$  cells/well) 24 hours prior to being treated with siRNA alone (including siGAPDH and controls), dendrimer alone (24 µg/mL), or dendriplexes (250 nmol/L siRNA, +/- ratio of 8). 48 hours later, the cells were trypsinized (0.25%) and collected, and the RNA was extracted according to the SV Total RNA Isolation System kit protocol (Promega Corporation, Madison, WI, USA). Reverse transcription polymerase chain reactions (PCR) were performed using the ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega), and real-time PCR using Stratagene Brilliant SYBR® Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) were performed to quantify *GAPDH* gene expression at the mRNA level using the housekeeping

gene  $\beta$ -actin to normalize mRNA quantities, as has been described before.<sup>[29]</sup>

#### HIV Inhibition

U87MG cells ( $3 \times 10^5$ ) were seeded in 6-well plates in complete medium and infected with the CXCR4-tropic (X4) HIV-1 strain X4-HIV NL4-3 or the CCR5-tropic (R5) strain R5-HIV BaL at a multiplicity of infection (MOI) of 1. The U87MG cells were washed twice with warm medium and treated with siRNA, dendrimers, or dendriplexes at varying concentrations and +/- ratios. Supernatants were collected 3 days later, and HIV-1 RNA was quantified by the Amplicor HIV-1 Monitor test (Roche Diagnostics Systems, Branchburg, NJ, USA), which utilized quantitative polymer chain reaction (qPCR).

## Results

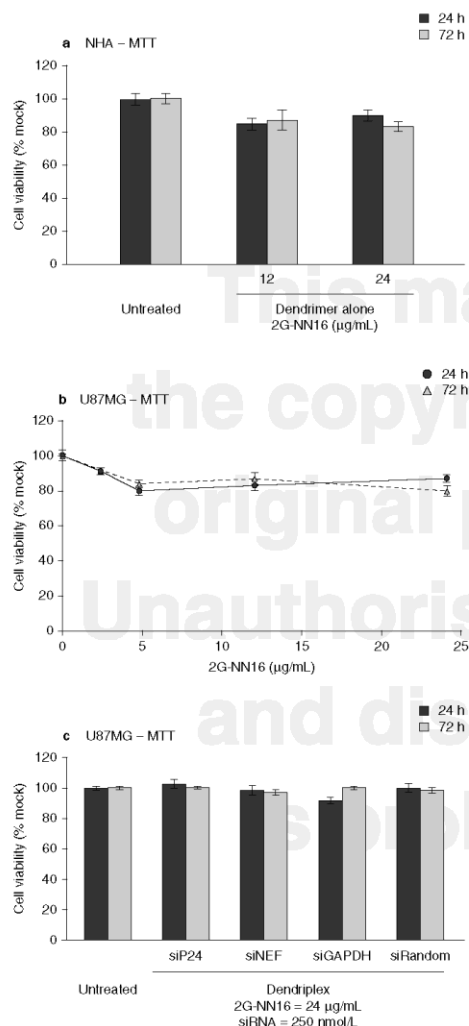
#### Time-Controlled Liberation of siRNA

All experiments were carried out using the 2G-NN16 dendrimer, the structure of which is depicted in figure 1a. To determine the kinetics of the interaction between carbosilane dendrimers and siRNA, samples of dendriplexes were analyzed by gel electrophoresis at various timepoints after dendriplex formation. For each timepoint, half of each sample was treated with heparin to reveal the quantity of siRNA still complexed to the dendrimer. Figure 1b shows the bands of liberated siRNA free to migrate in the gel at different timepoints. For either +/- charge ratios of 2 or 4, but particularly at a ratio of 4 (fourth lane), retention of siRNA by 2G-NN16 can be seen up through 12 hours, followed by a gradual liberation. Figure 1c shows the graphical analysis of the intensity of the siRNA bands. The percentage of siRNA complexed to and retained by 2G-NN16 can be determined by the difference between the intensities of the dendriplex bands and the heparin-treated dendriplex bands. This difference was a substantial value up until 24 hours, when it dropped to zero. These results indicate a gradual time-controlled degradation of the dendrimer and liberation of its siRNA cargo from 12 to 24 hours.

#### Dendrimers Lack Toxicity

Toxicity was tested for dendrimer alone and dendriplex on astrocytes by using an array of assays to measure membrane rupture, metabolic activity, and cell proliferation. Mitochondrial metabolism for both NHA (figure 2a) and U87MG as-





**Fig. 2.** Effect of carboxilane dendrimer 2G-NN16 on astrocytoma cell viability. (a) Toxic effects on normal human astrocytes (NHA) from treatment with 2G-NN16 are expressed in 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromide (MTT) reduction compared with non-treated controls. (b, c) Relative MTT reduction was measured for the U87MG human astrocytoma cell line submitted to (b) 2G-NN16 treatment and (c) 2G-NN16/small interfering RNA (siRNA) dendrimer treatment. **siGAPDH** = siRNA for housekeeping gene *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase); **siNEF** = siRNA for HIV-1 *nef*; **siP24** = siRNA for HIV-1 *gag* at the region of the p24 protein; **siRandom** = siRNA of random sequence.

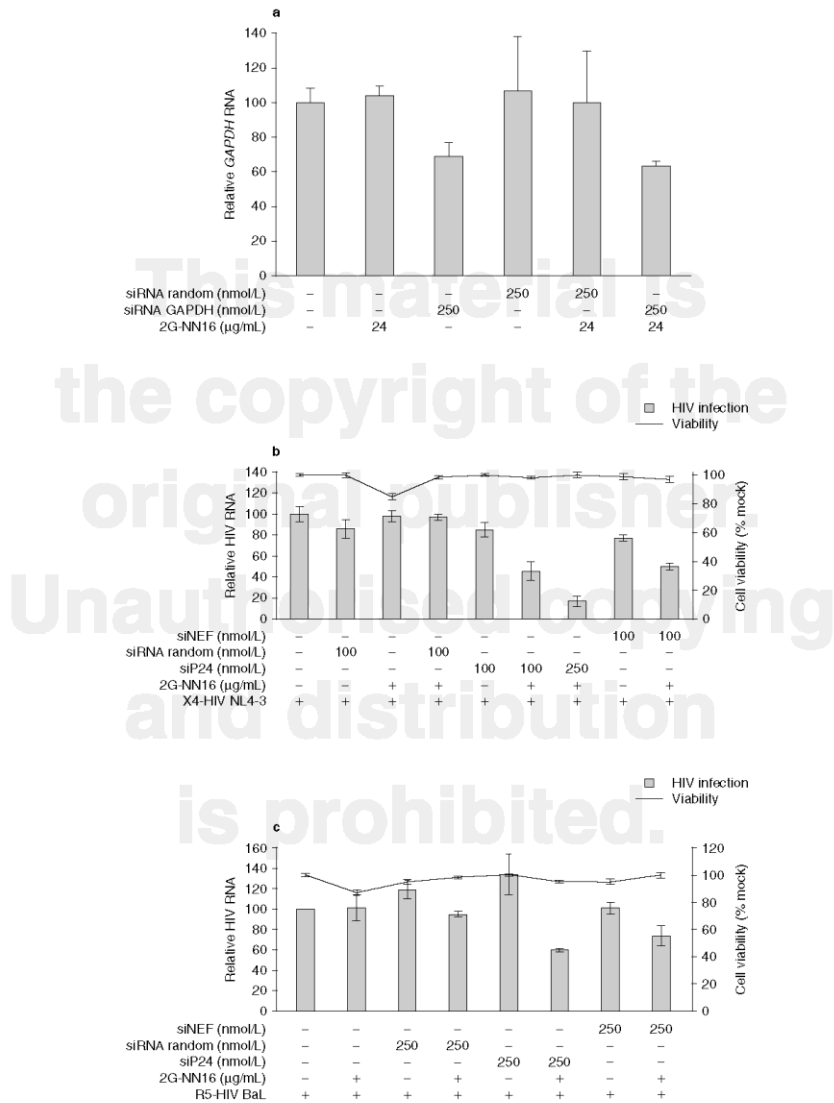
astrocytoma cells treated with 2G-NN16 alone (2.4–24 µg/mL) [figure 2b] or bound to different siRNAs (figure 2c) from 24 to 72 hours was measured by the MTT assay. Figure 2 shows that for all concentrations tested, MTT activity was above 80%, suggesting that 2G-NN16 was not toxic at those concentrations. In addition, we demonstrated a lack of toxicity in X4-HIV or R5-HIV infected U87MG astrocytoma cells treated with 2G-NN16 (2.4–24 µg/mL) after 72 hours (figure 3b, c). Our results show that the decrease of HIV-RNA in the supernatant of the cell cultures is a specific siRNA effect and is not a toxic effect.

To test the membrane rupture, LDH assays were carried out on U87MG cells, with 10% LDH release representing a limit above which treatments were considered toxic. For all concentrations of 2G-NN16 (4.6–24 µg/mL), no significant LDH release was observed after 3, 5, or 24 hours (figure 4a). The assays indicated the lack of toxicity of 2G-NN16 alone below 24 µg/mL concentrations. Furthermore, cell proliferation assays reflected that 2G-NN16 does not have an effect on proliferation of the astrocytoma cell line U87MG (figure 4b) or primary human astrocytes (NHA; data not shown).

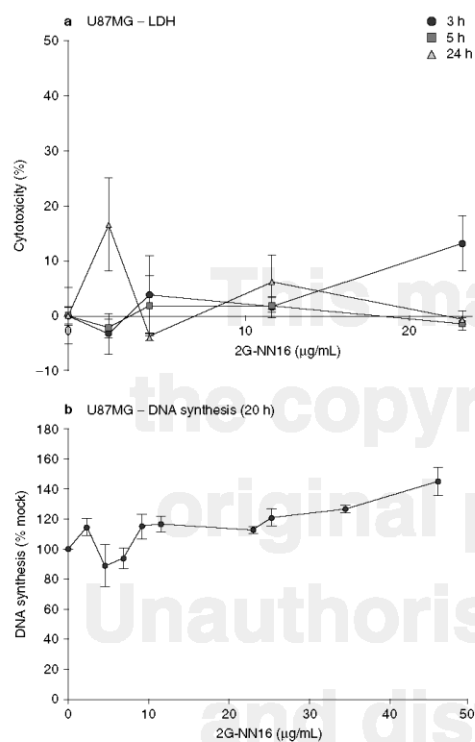
#### Transfection Efficiency of Carboxilane Dendrimer/siRNA Dendriplexes

To study siRNA delivery by 2G-NN16 in U87MG cultures, astrocytoma cells were treated with 250 nmol/L Cy3-labeled siP24 either alone or in dendriplex with 2G-NN16 at different ratios (2, 4, or 8) for different time periods, after which the cells were collected and analyzed by flow cytometry. As early as 3 hours after treatment, the incubation of U87MG with the dendriplex ratio of 8 resulted in a transfection efficiency >55% (figure 5a). After 18 hours, the efficiency of siRNA transfection was >85% in all cases (figure 5b). However, no uptake was detected for siRNA alone, and only low transfection efficiencies were observed for ratios 2 and 4. These results were different from the results previously obtained with CD4+ T lymphocytes treated with these dendriplexes, when the highest transfection efficiencies after 3 hours were seen for lower +/- ratios and for siRNA alone.<sup>[28]</sup> In flow cytometry assays, fluorescence intensity (x-median) represents the quantity of siRNA molecules that have been internalized by the cell. x-Median results after 3 hours indicate that the intensity of siRNA uptake in cells transfected with dendriplex at a ratio of 8 is similar to that in cells transfected with Lipofectin® (figure 5c). This was a level similar to that achieved with other previously described methods of transfection.<sup>[39,40]</sup>

To determine if complete internalization of the siRNA was accomplished in this cell line and to analyze the nature of the



**Fig. 3.** Biologic function of small interfering RNA (siRNA) delivered by carboxilane dendrimer 2G-NN16. (a) *GAPDH* was down-regulated in U87MG astrocytes treated with siRNA/2G-NN16 dendriplex. (b, c) U87MG astrocytes infected with HIV-1 strains (b) X4-HIV NL4-3 or (c) R5-HIV BaL were treated with siRNAs targeting HIV-1 *gag* at the region of the p24 protein (siP24) or HIV-1 *nef* (siNEF), either alone or in dendriplex with 2G-NN16. After 72 hours, cultures were assayed for viral load by quantitative PCR. Data showed a reduction in viral replication for siP24/2G-NN16 or siNEF/2G-NN16 dendriplexes in HIV-infected U87MG astrocytes. Also, we did not observe toxicity by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromide (MTT) assay in U87MG astrocytes infected with X4-HIV NL4-3 (b) or R5-HIV BaL (c). + and - symbols represent presence or absence of siRNA, dendrimer, or virus.



**Fig. 4.** Cytotoxicity and proliferative effect of carboxilane dendrimer 2G-NN16 on U87MG human astrocytoma cells. **(a)** Membrane rupture was detected by quantifying lactate dehydrogenase (LDH) concentration in supernatants from dendrimer-treated U87MG astrocytes. **(b)** Cell proliferation rates of U87MG astrocytes after treatment with 2G-NN16 showed no proliferative effect.

uptake, U87MG submitted to the same treatments as before were imaged with an immunofluorescence microscope 3 hours after treatment. By labeling the nucleus with DAPI and attempting to bring the nucleus into focus, it could be estimated whether the fluorochrome-labeled siRNA had gained entrance into the interior of the cells. Cells transfected with dendriplexes were observed to have higher uptake than cells treated with siRNA alone, and the images appeared to show the aggregation of Cy3 fluorescence in small clusters as well as regions where the fluorescence is more dispersed in the interior of the cells. This shows that the dendriplexes were endocytosed and were located inside the vesicles dispersed throughout the cytoplasm (figure 5d).

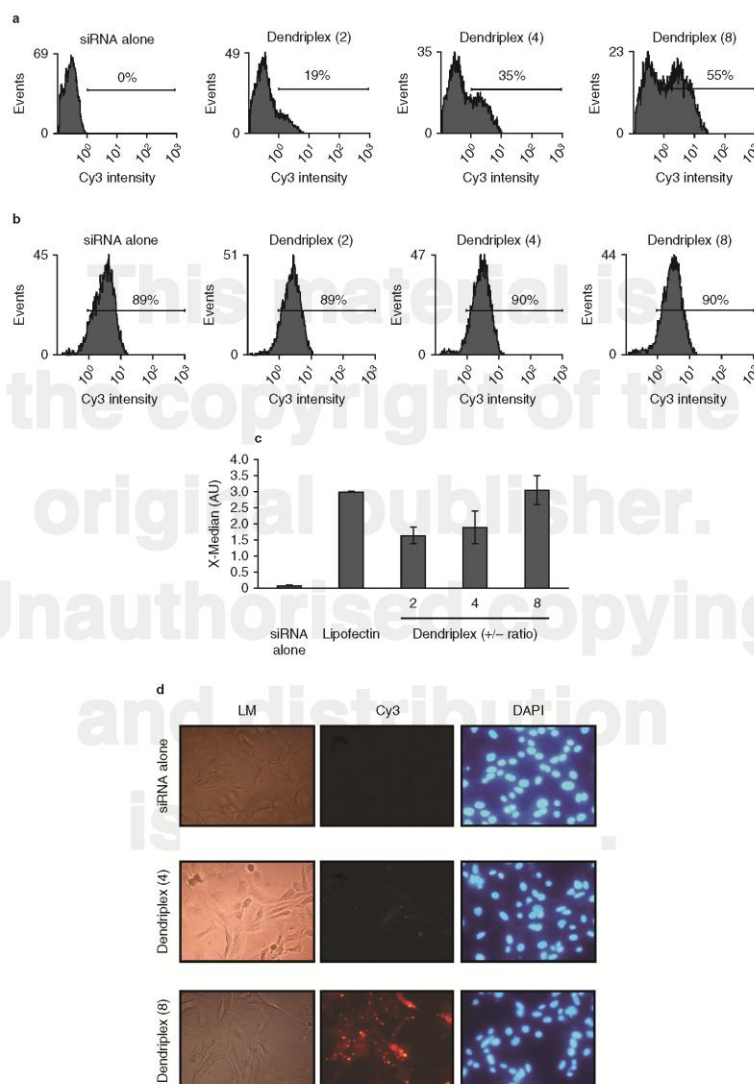
#### Transcytosis of Dendriplexes Through a Blood-Brain Barrier Model

The potential for dendriplexes to cross the BBB was assessed through the use of an *in vitro* model of BBB permeability utilizing bMVEC-B cells in a transwell chamber.<sup>[37,38]</sup> The formation of a tight monolayer with 100% confluence was determined by measuring the transepithelial electric resistance and was monitored with a light microscope. An image of the monolayer can be seen in figure 6a. siP24-FITC alone or 2G-NN16/siP24-FITC dendriplex was added to the bMVEC-B apical zone. U87MG cells were seeded in the basolateral zone and tested for siRNA uptake by flow cytometry either 5 or 72 hours after the treatment. Uptake of siRNA by the U87MG cells in the basolateral zone indicated successful transcytosis or crossing of the cell monolayer barrier and subsequent transfection of the target cells. These experiments revealed no uptake after 5 hours (figure 6b) and a high level of transfection after 72 hours (figure 6c). The lack of siRNA uptake after only 5 hours was evidence that the bMVEC-B monolayer had fully formed and that passive diffusion through the barrier did not occur, since transfection of U87MG from direct addition of 2G-NN16/siP24-FITC dendriplex at a ratio of 8 was seen to take only 3 hours (figure 5a).

#### siRNA Activity When Delivered by 2G-NN16

U87MG astrocytes were tested with siRNA silencing to determine the feasibility of this strategy with regard to exerting a biologic effect. Initial *GAPDH* knockdown experiments with these cells showed slight gene silencing for siRNA treatment alone or in dendriplex (31% and 37% reduced expression, respectively) compared with mock-treated or siRandom-treated control cells (figure 3a). The silencing was sequence-specific, because treatment with either siRandom alone or complexed with 2G-NN16 did not result in a decrease in *GAPDH* expression. In addition, dendrimer alone did not negatively affect *GAPDH* expression, indicating that cytotoxicity was not an issue.

X4-HIV NL4-3 and R5-HIV BaL strain viruses were used to infect U87MG cells, which were subsequently treated with siRNA alone, 2G-NN16 alone, or siP24/2G-NN16 dendriplex at a ratio of 8. siRNA was tested at concentrations of 100 or 250 nmol/L. After treatments had been administered, HIV-RNA was measured in U87MG supernatants collected 72 hours post-infection. Results showed a dose-dependent X4-HIV NL4-3 inhibition up to 85% for 250 nmol/L siP24 (figure 3b) and a R5-HIV BaL inhibition of 40% (figure 3c) when delivered by 2G-NN16 compared with mock-treated controls (HIV infected



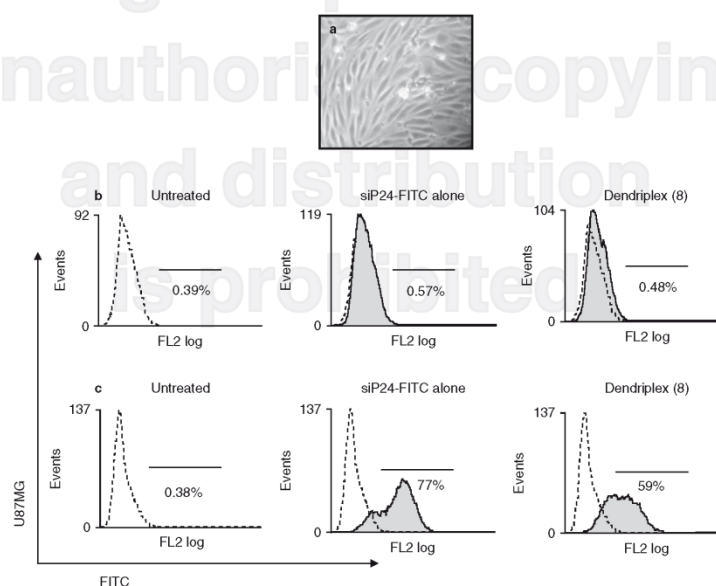
**Fig. 5.** Dendriplexes achieve high transfection efficiency in U87MG human astrocytoma cells. **(a, b)** Transfection efficiency was measured for U87MG astrocytes treated with Cy3-labeled small interfering RNA (siRNA) alone or in dendriplex at +/- ratios of 2, 4, or 8 [indicating the ratio of positive charge from the dendrimer relative to the negative charge from the siRNA] **(a)** 3 hours or **(b)** 18 hours after transfection. The y-axes represent the number of events and x-axes the Cy3 intensity. **(c)** Transfection efficiency (x-median value) 3 hours after treatment with siRNA alone, lipofectin, or dendriplex at various +/- ratios. **(d)** Immunofluorescence images of U87MG astrocytes treated with siRNA alone or in dendriplex at ratios of 4 and 8 show the presence of siRNA in the interior of the cells. Images show light microscope (LM), Cy3, and 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) detection. Dendriplex +/- ratios are indicated in parentheses. AU = arbitrary units of fluorescence.

U87MG cells without treatment with siRNA, dendrimer or dendriplex). Dendriplexes containing siNEF (100 nmol/L) also showed inhibition of HIV replication in the astrocytes (50%), which was similar to siP24 dendriplexes at the same concentration. Furthermore, 2G-NN16 by itself or random siRNA were not able to inhibit HIV infection (figure 3b–c), providing evidence that the inhibition was not due to cytotoxicity. Moreover, MTT assays for these experiments showed that the treatments were not toxic (figure 3b–c).

## Discussion

The emergence of new delivery methods such as nanoparticles could feasibly improve treatment of CNS disorders in HIV-infected patients. We have shown previously that 2G-NN16 carboxilane dendrimers work as delivery vehicles for siRNA and improve their effect on HIV inhibition in CD4+ T lymphocytes.<sup>[29]</sup> HIV and other lentiviruses differ from other viruses in their ability to infect targets like CD4+ T lymphocytes

and cells of the monocyte-macrophage lineage. However, CD4-negative cells may also be targeted, but these viral strains are highly sensitive to neutralization by host antibodies and are present only at sites where circulating antibody levels are low (e.g. in brain).<sup>[41]</sup> HIV is known to invade the CNS early in the course of infection, and its primarily targets brain mononuclear macrophages, perivascular macrophages, microglia, and astrocytes.<sup>[42]</sup> Entry pathways that do not involve CD4 receptors may play a role, as these cells do not express CD4 on their surface.<sup>[43,44]</sup> In this study, we show that 2G-NN16 dendrimers did not produce cytotoxicity in non-CD4+ human astrocytoma cells *in vitro*. In light of the results of MTT and LDH screening, the upper limit of the 2G-NN16 concentration for biologic assays was determined to be not lower than 24 µg/mL. These data corroborate previous findings regarding the toxic effects of 2G-NN16 on CD4+ T lymphocytes.<sup>[29]</sup> Toxicity profiles of dendriplexes formed from 2G-NN16 dendrimers and siRNA showed very similar values to those obtained for dendrimers alone, as has been reported elsewhere.<sup>[26,28,32,45]</sup> Both assays indicated that 2G-NN16 had a lack of toxicity at the concen-



**Fig. 6.** Transcytosis of a small interfering RNA (siRNA) targeting HIV-1 gagp24 (siP24) in an *in vitro* blood-brain barrier model. (a) Bovine brain microvascular endothelial cells (bMVEC-B) were grown into a tight monolayer in a transwell chamber. Fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled siP24 alone or bound to carboxilane dendrimers at a +/- ratio of 8 [dendriplex (8)] were added to the apical face, with U87MG human astrocytoma cells in the basolateral zone. After (b) 5 hours or (c) 72 hours, the cells from the basolateral zone were collected and analyzed by flow cytometry for siRNA uptake. **FL2 log** = name of the emission channel in the flow cytometry.

trations used in HIV inhibition experiments. In addition to the good cytotoxicity profile, the dendriplex distinguishes itself from other transfection nanoparticles like Lipofectin® in that the complex can form in medium containing serum and antibiotics, while for the correct formation of Lipofectin® complexes, these additives must be avoided. This is a fundamental advantage that will allow dendrimers to make the transition to *in vivo* scenarios.

A good nanoparticle transfectant that could be used for siRNA therapy for HIV infection should offer high transfection efficiency with an acceptable toxicity profile. The intention is not to achieve gene knockdown in a limited number of cells, but to inhibit HIV RNA translation on a wider scale throughout the whole system. Therefore, the number of transfected cells and the concentration of transfected siRNA per cell are both important for the efficiency of the treatment. Our study shows that 2G-NN16 dendrimers are highly efficient at transfecting the non-CD4+ human astrocytoma cells to a level similar to that obtained using more established techniques such as cationic lipid-based particles (figure 5c).<sup>[39,40,46,47]</sup> Furthermore, the time-controlled release of the siRNA cargo by the dendrimer, as has been shown here, is a tremendous advantage over other delivery vehicles and guarantees higher efficacy of siRNA once transfection into the interior of the target cells has been achieved.

There still remain many limits to reaching all HIV-susceptible cells with the use of current HIV therapy, in part because only some antiretrovirals have been shown to cross the BBB. Moreover, HAD is a very significant problem when addressing treatment for HIV infection. RNA interference strategies could potentially improve the inefficiency in CNS-targeting of HIV therapy by making use of siRNA targeted specifically to the virus. We have used siP24/2G-NN16 or siNEF/2G-NN16 dendriplexes as inhibitors of HIV replication. 2G-NN16 dendrimers alone were not able to inhibit HIV infection. However, inhibition was observed when siP24/2G-NN16 (85%) or siNEF/2G-NN16 (50%) was used compared with siRNAs alone or siRandom/2G-NN16. It is worth noting from figure 3 that random siRNA shows a value similar to non-treated U87MG HIV-infected cells. Thus, the HIV-1 inhibitory effect in U87MG is due to sequence-specific effects. Moreover, R5, X4, and R5/X4 isolates have all been shown in the brain of HIV-1-infected individuals.<sup>[48,49]</sup> We have shown that our dendriplexes inhibit not only X4-HIV strains but also R5-HIV strains. Therefore, the possibility of combining anti-HIV siRNA with other siRNA targeted to endogenous cellular genes necessary for HIV replication such as the CCR5 receptor could possibly improve results.<sup>[22]</sup> Further research and especially *in vivo* experiments

with carbosilane dendrimers as delivery agents will help to determine the potential usefulness of these molecules for the treatment of many diseases such as HIV infection.

Despite promising data, the use of nanoparticles for siRNA delivery to the brain remains at the experimental stage. Nanoparticles of sizes <100 nm cross the BBB more easily than larger ones (200–300 nm) to achieve higher overall levels in the brain, but they also penetrate deeper into brain tissues.<sup>[50]</sup> Although our dendriplexes are approximately 300 nm,<sup>[29]</sup> we have observed transcytosis of dendriplexes through the BBB in an *in vitro* model. Moreover, the BBB is inherently negative in charge, so, in theory, cationic carriers should result in a higher degree of delivery to the brain. However, neutral carriers have been shown to exhibit the strongest *in vitro* and *in vivo* stability<sup>[51,52]</sup> and to increase the BBB permeability of therapeutic agents such as DNA.<sup>[53]</sup> Therefore, neutral and positively charged nanoparticles have the most potential for transversing the BBB and therefore are potential candidates for drug delivery to the brain. Previous results have shown that our dendriplexes possess a neutral or slightly positive charge,<sup>[29]</sup> and results reported here have shown that these dendriplexes are capable of crossing the BBB.<sup>[54,55]</sup>

Although the data are very promising, it is important to note that we have used an *in vitro* model of the BBB that has limitations in reproducing the behavior of the BBB *in vivo*. For example, while a dendriplex can be efficiently taken up and pass through brain microvessel endothelial cells, this does not necessarily translate into high BBB permeability. What is more, the lack of appropriate *in vivo* models to simulate the changes in BBB integrity in HIV infection is a major obstacle to further development of brain delivery strategies. There has been increasing evidence to indicate the existence of structural and functional alterations of the BBB during HIV infection.<sup>[56,57]</sup> In particular, key membrane proteins (e.g. occludin and zona occludens-1) that play a role in the formation of the tight junctions in the brain capillary endothelium are significantly down-regulated during HIV infection.<sup>[58]</sup> Therefore, more work is needed to clearly establish the changes in BBB integrity during HIV infection.

## Conclusions

2G-NN16 carbosilane dendrimers successfully deliver and transfect siRNA to human astrocytes, transport the oligonucleotides across an *in vitro* BBB model, and achieve sequence-specific gene silencing and a reduction in X4-HIV NL4-3 or R5-HIV BaL replication without causing cytotoxicity.

## Acknowledgments

This work was supported by grants from Fundación para la Investigación y Prevención del SIDA en España, FIPSE (240800/09), Red Temática de Investigación Cooperativa Sanitaria ISCIII (RETIC RD06/0006/0035), MNT-ERA NET 2007 (NAN2007-31198-E), Fondos de Investigación Sanitaria (FIS PS09/02029; PS09/02669), Fundación Caja Navarra, Comunidad Autónoma de Madrid (S-SAL-0159-2006), and COST Action (TD0802) to Dr Muñoz-Fernández. Authors from the Universidad de Alcalá were supported by MNT-ERA NET 2007 (NAN2007-31135-E) and Fondo de Investigación Sanitaria (PI040993). Dr José Luis Jiménez was supported by FIS PI081495 and Programa de Investigación de la Consejería Sanidad de la Comunidad de Madrid, and Dr López-Fernández was supported by FIS CP06/0267 Miguel Servet Program. Maria Isabel Clemente is the holder of a fellowship from Fondo de Investigaciones Sanitarias (FI0501093). We would like to thank Laura Diaz for her assistance with flow cytometry analysis.

The authors have no conflicts of interest that are directly relevant to the content of this study.

## References

- Sacktor N, Lyles RH, Skolasky R, et al. HIV-associated neurologic disease incidence changes: multicenter AIDS cohort study, 1990-1998. *Neurology* 2001 Jan 23; 56 (2): 257-60
- Lindl KA, Marks DR, Kolson DL, et al. HIV-associated neurocognitive disorder: pathogenesis and therapeutic opportunities. *J Neuroimmune Pharmacol*. Epub 2010 Apr 16
- Ellis RJ, Deutsch R, Heaton RK, et al. Neurocognitive impairment is an independent risk factor for death in HIV infection. San Diego HIV Neurobehavioral Research Center Group. *Arch Neurol* 1997 Apr; 54 (4): 416-24
- Sanchez-Ramon S, Resino S, Bellon Cano JM, et al. Neuroprotective effects of early antiretrovirals in vertical HIV infection. *Pediatr Neurol* 2003 Sep; 29 (3): 218-21
- Canto-Nogues C, Sanchez-Ramon S, Alvarez S, et al. HIV-1 infection of neurons might account for progressive HIV-1-associated encephalopathy in children. *J Mol Neurosci* 2005; 27 (1): 79-89
- Gonzalez-Scarano F, Martin-Garcia J. The neuropathogenesis of AIDS. *Nat Rev Immunol* 2005 Jan; 5 (1): 69-81
- Kerza-Kwiatkiewicz AP, Amini S. CNS as an HIV-1 reservoir: BBB and drug delivery. *J Neurovirol* 1999 Apr; 5 (2): 113-4
- Brew BJ. HIV, the brain, children, HAART and 'neuro-HAART': a complex mix. *Aids* 2009 Sep 10; 23 (14): 1909-10
- Ghafouri M, Amini S, Khalili K, et al. HIV-1 associated dementia: symptoms and causes. *Retrovirology* 2006; 3: 28
- McArthur JC, Haughey N, Gartner S, et al. Human immunodeficiency virus-associated dementia: an evolving disease. *J Neurovirol* 2003 Apr; 9 (2): 205-21
- Clifford DB. HIV-associated neurocognitive disease continues in the antiretroviral era. *Top HIV Med* 2008 Jun-Jul; 16 (2): 94-8
- Tozzi V, Balestra P, Bellagamba R, et al. Persistence of neuropsychologic deficits despite long-term highly active antiretroviral therapy in patients with HIV-related neurocognitive impairment: prevalence and risk factors. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007 Jun 1; 45 (2): 174-82
- Wynn HE, Brundage RC, Fletcher CV. Clinical implications of CNS penetration of antiretroviral drugs. *CNS Drugs* 2002; 16 (9): 595-609
- Sharp PA. RNA interference: 2001. *Genes Dev* 2001 Mar 1; 15 (5): 485-90
- Coburn GA, Cullen BR. siRNAs: a new wave of RNA-based therapeutics. *J Antimicrob Chemother* 2003 Apr; 51 (4): 753-6
- Lee MT, Coburn GA, McClure MO, et al. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in primary macrophages by using Tat- or CCR5-specific small interfering RNAs expressed from a lentivirus vector. *J Virol* 2003 Nov; 77 (22): 11964-72
- Han W, Wind-Rotolo M, Kirkman RL, et al. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by siRNA targeted to the highly conserved primer binding site. *Virology* 2004 Dec 5; 330 (1): 221-32
- Novina CD, Murray MF, Dykxhoorn DM, et al. siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection. *Nat Med* 2002 Jul; 8 (7): 681-6
- Nishitsuji H, Kohara M, Kannagi M, et al. Effective suppression of human immunodeficiency virus type 1 through a combination of short- or long-hairpin RNAs targeting essential sequences for retroviral integration. *J Virol* 2006 Aug; 80 (15): 7658-66
- Pomerantz RJ. RNA interference meets HIV-1: will silence be golden? *Nat Med* 2002 Jul; 8 (7): 659-60
- Liu YP, Haasnoot J, ter Brake O, et al. Inhibition of HIV-1 by multiple siRNAs expressed from a single microRNA polycistron. *Nucleic Acids Res* 2008 May; 36 (9): 2811-24
- Kumar P, Ban HS, Kim SS, et al. T cell-specific siRNA delivery suppresses HIV-1 infection in humanized mice. *Cell* 2008 Aug 22; 134 (4): 577-86
- Song E, Zhu P, Lee SK, et al. Antibody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors. *Nat Biotechnol* 2005 Jun; 23 (6): 709-17
- Mintzer MA, Simanek EE. Nonviral vectors for gene delivery. *Chem Rev* 2009 Feb; 109 (2): 259-302
- Whitehead KA, Langer R, Anderson DG. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. *Nat Rev Drug Discov* 2009 Feb; 8 (2): 129-38
- Fischer D, Li Y, Ahlemeyer B, et al. In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials* 2003 Mar; 24 (7): 1121-31
- Kurreck J. RNA interference: from basic research to therapeutic applications. *Angew Chem Int Ed Engl* 2009; 48 (8): 1378-98
- Ortega P, Bermejo JF, Chonco L, et al. Novel water-soluble carbosilane dendrimers: synthesis and biocompatibility. *Eur J Inorg Chem* 2006; (7): 1388-96
- Weber N, Ortega P, Clemente MI, et al. Characterization of carbosilane dendrimers as effective carriers of siRNA to HIV-infected lymphocytes. *J Control Release* 2008 Nov 24; 132 (1): 55-64
- Fréchet JMJ. Dendrimers and other dendritic macromolecules: from building blocks to functional assemblies in nanoscience and nanotechnology. *J Polymer Sci Part A: Polymer Chem* 2003 Mar; 41 (3): 290-300
- Loscher W, Potschka H. Role of drug efflux transporters in the brain for drug disposition and treatment of brain diseases. *Prog Neurobiol* 2005 May; 76 (1): 22-76
- Bermejo JF, Ortega P, Chonco L, et al. Water-soluble carbosilane dendrimers: synthesis biocompatibility and complexation with oligonucleotides; evaluation for medical applications. *Chemistry* 2007; 13 (2): 483-95
- Chonco L, Bermejo-Martin JF, Ortega P, et al. Water-soluble carbosilane dendrimers protect phosphorothioate oligonucleotides from binding to serum proteins. *Org Biomol Chem* 2007 Jun 21; 5 (12): 1886-93
- Song E, Lee SK, Dykxhoorn DM, et al. Sustained small interfering RNA-mediated human immunodeficiency virus type 1 inhibition in primary macrophages. *J Virol* 2003 Jul; 77 (13): 7174-81
- Capodici J, Kariko K, Weissman D. Inhibition of HIV-1 infection by small interfering RNA-mediated RNA interference. *J Immunol* 2002 Nov 1; 169 (9): 5196-201
- Das AT, Brummelkamp TR, Westerhout EM, et al. Human immunodeficiency virus type 1 escapes from RNA interference-mediated inhibition. *J Virol* 2004 Mar; 78 (5): 2601-5
- Toborek M, Lee YW, Flora G, et al. Mechanisms of the blood-brain barrier disruption in HIV-1 infection. *Cell Mol Neurobiol* 2005 Feb; 25 (1): 181-99

38. Kuo YC, Chen HH. Effect of nanoparticulate polybutylcyanoacrylate and methylmethacrylate-sulfopropylmethacrylate on the permeability of zidovudine and lamivudine across the in vitro blood-brain barrier. *Int J Pharm* 2006 Dec 11; 327 (1-2): 160-9
39. Hartig PC, Hunter 3rd ES. Gene delivery to the neurulating embryo during culture. *Teratology* 1998 Sep-Oct; 58 (3-4): 103-12
40. Sata M, Walsh K. Endothelial cell apoptosis induced by oxidized LDL is associated with the down-regulation of the cellular caspase inhibitor FLIP. *J Biol Chem* 1998 Dec 11; 273 (50): 33103-6
41. Kolchinsky P, Kiprilov E, Sodroski J. Increased neutralization sensitivity of CD4-independent human immunodeficiency virus variants. *J Virol* 2001 Mar; 75 (5): 2041-50
42. Trillo-Pazos G, Diamanturos A, Rislove L, et al. Detection of HIV-1 DNA in microglia/macrophages, astrocytes and neurons isolated from brain tissue with HIV-1 encephalitis by laser capture microdissection. *Brain Pathol* 2003 Apr; 13 (2): 144-54
43. Alvarez Losada S, Canto-Nogues C, Munoz-Fernandez MA. A new possible mechanism of human immunodeficiency virus type 1 infection of neural cells. *Neurobiol Dis* 2002 Dec; 11 (3): 469-78
44. Liu Y, Liu H, Kim BO, et al. CD4-independent infection of astrocytes by human immunodeficiency virus type 1: requirement for the human mannose receptor. *J Virol* 2004 Apr; 78 (8): 4120-33
45. Jevprasephant R, Penny J, Jalal R, et al. The influence of surface modification on the cytotoxicity of PAMAM dendrimers. *Int J Pharm* 2003 Feb 18; 252 (1-2): 263-6
46. Vogelbaum MA, Tong JX, Higashikubo R, et al. Transfection of C6 glioma cells with the bax gene and increased sensitivity to treatment with cytosine arabinoside. *J Neurosurg* 1998 Jan; 88 (1): 99-105
47. Lampela P, Soiminen P, Urtti A, et al. Synergism in gene delivery by small PEIs and three different nonviral vectors. *Int J Pharm* 2004 Feb 11; 270 (1-2): 175-84
48. Alvarez S, Jimenez JL, Serramia MJ, et al. Lack of association of HIV-1 biological or molecular properties with neurotropism for brain cells. *J Mol Neurosci* 2006; 29 (2): 131-44
49. Gorry PR, Bristol G, Zack JA, et al. Macrophage tropism of human immunodeficiency virus type 1 isolates from brain and lymphoid tissues predicts neurotropism independent of coreceptor specificity. *J Virol* 2001 Nov; 75 (21): 10073-89
50. MacKay JA, Deen DF, Szoka Jr FC. Distribution in brain of liposomes after convection enhanced delivery: modulation by particle charge, particle diameter, and presence of steric coating. *Brain Res* 2005 Feb 28; 1035 (2): 139-53
51. Lockman PR, Koziara JM, Mumper RJ, et al. Nanoparticle surface charges alter blood-brain barrier integrity and permeability. *J Drug Target* 2004; 12 (9-10): 635-41
52. Fenart L, Casanova A, Dehouck B, et al. Evaluation of effect of charge and lipid coating on ability of 60-nm nanoparticles to cross an in vitro model of the blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther* 1999 Dec; 291 (3): 1017-22
53. Huang RQ, Qu YH, Ke WL, et al. Efficient gene delivery targeted to the brain using a transferrin-conjugated polyethyleneglycol-modified polyamidoamine dendrimer. *Faseb J* 2007 Apr; 21 (4): 1117-25
54. Dehouck B, Fenart L, Dehouck MP, et al. A new function for the LDL receptor: transcytosis of LDL across the blood-brain barrier. *J Cell Biol* 1997 Aug 25; 138 (4): 877-89
55. Balazs Z, Panzenboeck U, Hammer A, et al. Uptake and transport of high-density lipoprotein (HDL) and HDL-associated alpha-tocopherol by an in vitro blood-brain barrier model. *J Neurochem* 2004 May; 89 (4): 939-50
56. Yousif S, Marie-Claire C, Roux F, et al. Expression of drug transporters at the blood-brain barrier using an optimized isolated rat brain microvessel strategy. *Brain Res* 2007 Feb 23; 1134 (1): 1-11
57. Giovannoni G, Miller RF, Heales SJ, et al. Elevated cerebrospinal fluid and serum nitrate and nitrite levels in patients with central nervous system complications of HIV-1 infection: a correlation with blood-brain-barrier dysfunction. *J Neurol Sci* 1998; 156 (1): 53-8
58. Petito CK, Cash KS. Blood-brain barrier abnormalities in the acquired immunodeficiency syndrome: immunohistochemical localization of serum proteins in postmortem brain. *Ann Neurol* 1992 Nov; 32 (5): 658-66

Correspondence: Dr M. Ángeles Muñoz-Fernández, Laboratorio Inmunobiología Molecular, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, C/Dr. Esquerdo 46, 28007, Madrid, Spain.  
E-mail: mmunoz.hgum@salud.madrid.org

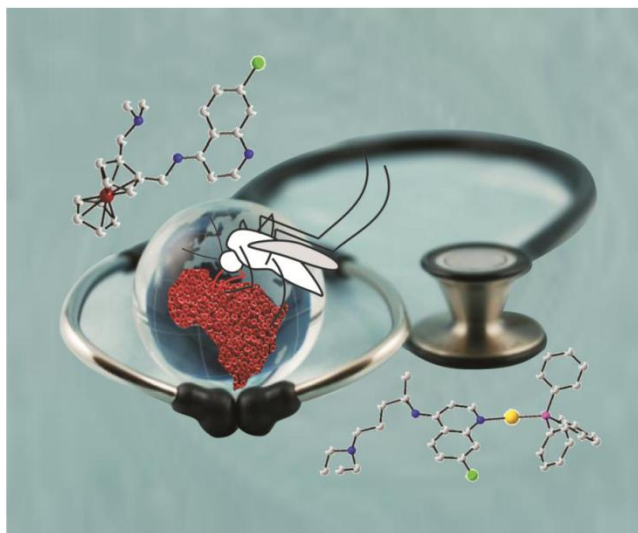


This paper is published as part of a *Dalton Transactions* themed issue entitled:

## Application of inorganic chemistry for non-cancer therapeutics

Guest Editor: Katherine J. Franz

Published in issue 21, 2012 of *Dalton Transactions*



*Image reproduced with permission of Christophe Biot*

Articles published in this issue include:

[The therapeutic potential of metal-based antimalarial agents: Implications for the mechanism of action](#)

Christophe Biot, William Castro, Cyrille Y. Botté and Maribel Navarro  
*Dalton Trans.*, 2012, DOI: 10.1039/C2DT12247B

[Chelation therapy in Wilson's disease: from D-penicillamine to the design of selective bioinspired intracellular Cu\(I\) chelators](#)

Pascale Delangle and Elisabeth Mintz  
*Dalton Trans.*, 2012, DOI: 10.1039/C2DT12188C

[Therapeutic potential of selenium and tellurium compounds: Opportunities yet unrealised](#)

Edward R. T. Tiekink  
*Dalton Trans.*, 2012, DOI: 10.1039/C2DT12225A

Visit the *Dalton Transactions* website for more cutting-edge bioinorganic chemistry research

[www.rsc.org/dalton](http://www.rsc.org/dalton)

Cite this: *Dalton Trans.*, 2012, **41**, 6488

www.rsc.org/dalton

PAPER

**Polyanionic N-donor ligands as chelating agents in transition metal complexes: synthesis, structural characterization and antiviral properties against HIV**Sandra García-Gallego,<sup>†a</sup> Javier Sánchez Rodríguez,<sup>†b</sup> José Luis Jiménez,<sup>b</sup> Michela Cangiotti,<sup>c</sup> Maria Francesca Ottaviani,<sup>\*c</sup> M. Ángeles Muñoz-Fernández,<sup>\*d</sup> Rafael Gómez<sup>\*a</sup> and F. Javier de la Mata<sup>\*a</sup>

Received 21st September 2011, Accepted 21st December 2011

DOI: 10.1039/c2dt11793b

We describe here the synthesis and characterization of new sulfonated and carboxylated-containing N-donor ligands [Na<sub>4</sub>(edts)]·4H<sub>2</sub>O (**2**), [Na<sub>2</sub>(dmeddp)]·2H<sub>2</sub>O (**3**) and [Na<sub>4</sub>(edtp)]·H<sub>2</sub>O (**4**) (edts = ethylene-diamine-*N,N,N',N'*-tetraethylenesulfonate ion; dmeddp = dimethyl-ethylene-diamine-*N,N,N',N'*-tetra-3-propionate ion; edtp = ethylene-diamine-*N,N,N',N'*-tetra-3-propionate ion) and their corresponding metal (Ni, Co, Cu and Zn) complexes. Mainly, UV-Vis and a computer aided analysis of the EPR spectra provided information on the geometry and structure of the complexes in solution. Some of the metal complexes inhibit HIV replication when treating both pre- and post-infected PBMC cells, and hustle the inhibitory effect compared to the metal salts alone.

**Introduction**

Despite great progress that has recently been made in biomedical sciences, viral infectious diseases still remain one of the most common world health problems, and hence various methods of treating them are available. In the case of HIV, although various treatments are known in the art,<sup>1</sup> almost all of them have one or more disadvantages. Therefore, there is a need to provide improved new methods and compositions for treatment of viral infections.

One approach consists of stimulating the immune response of a system, by modulating the Th1/Th2 ratio response. This can be achieved through the administration of cytokines or other immunomodulatory substances, such as Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, NO and glutation.<sup>2</sup>

Another approach deals with a direct targeting of the virus through an appropriate antiviral drug, or a cocktail of drugs, as

in the HAART (Highly Active Anti-Retroviral Therapy) against HIV,<sup>3</sup> where some problems are associated with side effects, such as fatigue, fever, diarrhoea or nausea, and relatively high costs. In this approach, the compounds attack different points in the replicative cycle of HIV. However, the viral infection begins with the entry of the virus into the host cell. Considering this knowledge, the virus entry machinery is, therefore, an excellent target for antiviral therapeutics. Thus, the development of inhibitors against these steps has been the focus of the pharmaceutical industry. Among the most effective inhibitors are polyanionic ligands<sup>4,5</sup> (polysulfates, polysulfonates, polycarboxylates) and some metal complexes (polyoxometallates and metalloporphyrins). The use of chelating agents, such as EDTA (ethylene-diaminetetraacetate) and their derivatives, especially those which chelate Mg<sup>2+</sup> and/or Ca<sup>2+</sup>, has been found to promote disintegration of retrovirus membranes.<sup>6</sup> Moreover, chelating agents may further reduce infectivity of certain viruses. It has also been demonstrated that the ligand by itself, the tetrasodium EDTA, is capable of neutralizing both enveloped and nonenveloped viruses, and also Gram-positive bacteria.<sup>7</sup> In addition, EDTA derivatives have a wide range of applications, most of the properties based on the ability of these ligands to interact with metal cations. Some bismuth complexes of EDTA exhibited inhibition against the SARS coronavirus helicase.<sup>8</sup> However, these bismuth derivatives had little effectiveness due to the tight coordination of the metal ion, as free Bi<sup>3+</sup> ions play a critical role in the inhibition of these enzymes. Also, in later steps of the virus replicative cycle, the antiviral activity of zinc ion can be improved by using compositions that comprise an ionic multi-valent metal component (e.g. a zinc salt) in combination of a cationic surfactant (e.g. benzalkonium ion) and a cationic polymer (e.g. chitosan).<sup>9</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Química Inorgánica, Universidad de Alcalá, Campus Universitario, E-28871 Alcalá de Henares (Spain). Networking Research Center on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), Spain. E-mail: javier.delamata@uah.es; Fax: (+34) 91 8854683; Tel: (+34) 91 8854654

<sup>b</sup>Plataforma de laboratorio, Laboratorio de Inmunobiología Molecular, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid (Spain). Networking Research Center on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), Spain

<sup>c</sup>Department of Earth, Life and Environment Sciences, 61029 Urbino, Italy

<sup>d</sup>Laboratorio de Inmunobiología Molecular, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid (Spain). Networking Research Center on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), Spain. E-mail: mmunoz.hgugm@salud.madrid.org

<sup>†</sup> both authors contributed equally to the work

In our previous work,<sup>10</sup> we have performed the synthesis of the ligand  $[H_2(dmedds)]$ ,  $N,N'$ -dimethylethylenediamino- $N,N'$ -diethanesulfonic acid, and its sodium salt form  $[Na_2(dmedds)] \cdot 2H_2O$  (**1**). The metal complexes of ligand **1**, of nickel (**1-Ni**), cobalt (**1-Co**), copper (**1-Cu**) and zinc (**1-Zn**), presented dual antiviral activity, by acting before and after the virus infection. As a continuation of this work, herein we describe the synthesis and characterization of new sulfonated and carboxylated-containing N-donor ligands, in their sodium salt forms, and their corresponding metal (Ni, Co, Cu and Zn) complexes. This study aims to determine whether the presence of metals in the anionic ligands used here results in a beneficial and cooperative behavior in their antiviral activity against HIV, and the possible distinction between carboxylated and sulfonated ligands, if any.

## Results and discussion

### Synthesis and characterization of the ligands

In the present study, various polyanionic ligands were synthesized by means of the method developed by Liang *et al.*<sup>11</sup> using Michael-type addition reaction. The conjugate addition of the primary amine ethylenediamine to sodium vinylsulfonate in aqueous solution in a 1 : 4 ratio at 120 °C for 24 h led to the formation of the compound  $[Na_4(edts)] \cdot 4H_2O$  (**2**) as a white solid in quantitative yield on the basis of its analytical data (see Scheme 1). In an analogous way, the conjugate addition of an excess of methyl acrylate to the secondary amine  $N,N'$ -dimethylethylenediamine or to the primary amine ethylenediamine at room temperature for 24 h, gave the compounds  $[Me_2(dmeddp)] \cdot 2H_2O$  (**3-Me**) and  $[Me_4(edtp)] \cdot H_2O$  (**4-Me**).<sup>12,13</sup> These compounds, with methyl ester groups, are the precursors of the ligands **3** and **4**, their respective sodium salt forms. The addition of aqueous sodium hydroxide to these precursors led to the formation of the compounds  $[Na_2(dmeddp)] \cdot 2H_2O$  (**3**) and  $[Na_4(edtp)] \cdot H_2O$  (**4**)<sup>14</sup> as white solids in quantitative yield on the basis of its analytical data (see Scheme 1). All of them are very soluble in water, slightly soluble in methanol or ethanol and insoluble in organic solvents.

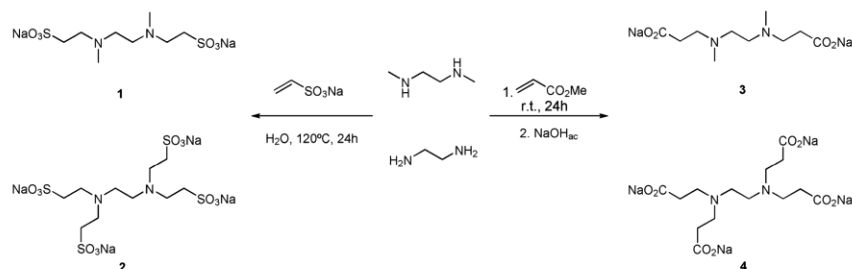
For ligand **2**, the <sup>1</sup>H-NMR spectrum shows for the methylene units of the diethanesulfonate fragment two multiplets at  $\delta$  = 2.90 ppm for the -SCH<sub>2</sub>- unit and 2.80 ppm for the -CH<sub>2</sub>N- unit on the basis of NOESY experiments. A singlet at  $\delta$  = 2.52 ppm is observed for the equivalent methylene groups -NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-.

Respecting the <sup>13</sup>C-NMR spectrum, three resonances were observed and assigned on the basis of HMQC experiments, the -NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N- groups appear at  $\delta$  = 50.0 while the resonances at  $\delta$  = 47.9 and 47.0 ppm are attributed to -CH<sub>2</sub>N- and -SCH<sub>2</sub>- fragments of the ethylenesulfonate group in that order.

In the case of the carboxylate ligands **3** and **4**, their precursors **3-Me** and **4-Me** are characterized by NMR in CDCl<sub>3</sub>. In the <sup>1</sup>H-NMR spectrum of **3-Me**, the methyl ester group CO<sub>2</sub>Me shows a singlet at  $\delta$  = 3.60 ppm, while the methylene units of the diethanecarboxylate fragment appear as two multiplets at  $\delta$  = 2.49 ppm for the -CCH<sub>2</sub>- unit and 2.38 ppm for the -CH<sub>2</sub>N- unit on the basis of NOESY experiments, the latter overlapped with a singlet for the equivalent methylene groups -NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-. Finally, the NCH<sub>3</sub> group appears as a singlet at  $\delta$  = 2.14 ppm. In the <sup>13</sup>C-NMR spectrum, the resonances were assigned on the basis of HMQC experiments; for the CO<sub>2</sub>Me fragment, two resonances at  $\delta$  = 172.8 and 51.4 ppm are observed, for the carbonyl and the methyl groups respectively. The -NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N- groups appear at  $\delta$  = 54.9 while the resonances at  $\delta$  = 52.9 and 32.0 ppm are attributed to -CH<sub>2</sub>C- and -NCH<sub>2</sub>- fragments of the ethylenecarboxylate group in that order; and finally, the NCH<sub>3</sub> group appears as a singlet at  $\delta$  = 42.1 ppm. The precursor **4-Me** shows similar NMR data to those of **3-Me** (see Experimental section).

The sodium salt ligands **3** and **4**, were characterized by NMR experiments in D<sub>2</sub>O. In the <sup>1</sup>H-NMR spectrum of **3**, the methylene units of the diethanecarboxylate fragment appear as two multiplets at  $\delta$  = 2.48 ppm for the -CCH<sub>2</sub>- unit and 2.14 ppm for the -CH<sub>2</sub>N- unit on the basis of NOESY experiments. Also, at  $\delta$  = 2.35 ppm a singlet is observed for the equivalent methylene groups -NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-, and the NCH<sub>3</sub> group appears as a singlet at  $\delta$  = 2.00 ppm. In the <sup>13</sup>C-NMR spectrum of **3**, the resonances were assigned on the basis of HMQC experiments; for the CO<sub>2</sub>Na fragment, the carbonyl group shows a resonance at  $\delta$  = 181.4. The -NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N- groups appear at  $\delta$  = 53.4 while the resonances at  $\delta$  = 52.9 and 34.4 ppm are attributed to -CH<sub>2</sub>C- and -NCH<sub>2</sub>- fragments of the ethylenecarboxylate group in that order. Finally, the NCH<sub>3</sub> group appears as a singlet at  $\delta$  = 40.8 ppm. The ligand **4** shows similar NMR data to those of **3** (see Experimental section).

**Potentiometric titrations.** The protonation behaviour of the ligands depending on the pH of the medium has been studied *via* potentiometric titration in pure distilled water without ionic



Scheme 1 Synthesis of ligands 1–4.

**Table 1**  $pK_a$  values for the ligands **1**, **2**, **3** and **4**

Ligand	$pK_{a1}$	$pK_{a2}$	Ref.
<b>1</b>	4.67	9.71	10*
<b>2</b>	4.63	9.12	This work
<b>3</b>	4.79	8.00	This work
<b>4</b>	5.01	8.09	This work

strength. The systems present two equivalent tertiary amines and two/four anionic groups showing a pronounced difference in their protonation processes. In fact, the titration curve displays two  $pK_a$  values that we assign to the two acidic dissociation constants of the ammonium groups (Table 1). Although, the existence of a broad peak for the first  $pK$  in the case of carboxylate derivatives may be indicative that other protonation processes can occur associated to the carboxylate groups, this is in agreement with the theoretical values expected for these processes.

As demonstrated in our previous work, similar values have been observed for analogous systems referred as Good's buffers.<sup>15–17</sup>

The variation of the  $pK_a$  values is in agreement with the differences in their structure,<sup>18</sup> and may be attributed to a compromise due to two factors: (i) a different electron-withdrawing effect of the sulfonate groups compared to the carboxylate ones; and (ii) the electrostatic effect resulting from the presence of two negatively charged groups instead of four, attached to the nitrogen.

From these values at physiological pH, sulfonate and carboxylate groups can be found in their anionic form, *ergo* we can hypothesize that they could be more available to inhibit viral infection by interacting with viral proteins through this ionic charge.

#### Synthesis and characterization of the metal complexes

As previously described for ligand **1**,<sup>10</sup> ligands **2**, **3** and **4** were used to synthesize transition metal complexes based on Ni (**n-Ni**), Co (**n-Co**), Cu (**n-Cu**) and Zn (**n-Zn**), where **n** indicates the type of ligand (**n** = **1**, **2**, **3**, **4**), (see Scheme 2).

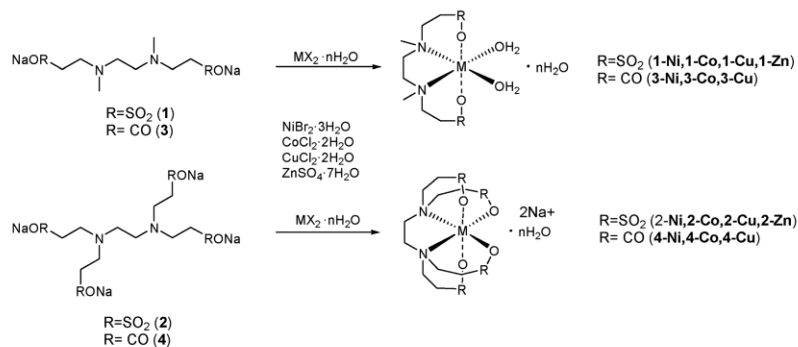
Treatment of **2** with one equivalent of  $NiBr_2 \cdot 3H_2O$  in water afforded a green solution that, after concentration and

precipitation with ethanol, allowed us to obtain **2-Ni** without any by-product. The final green solid corresponds to  $\{Na_2[Ni(edts)]\} \cdot 4H_2O$  (**2-Ni**) in 78% yield on the basis of quantitative analysis. The analogous reaction with  $CoCl_2 \cdot 2H_2O$  led to the formation of a pink solution, whose treatment afforded a pure violet solid of  $\{Na_2[Co(edts)]\} \cdot 4H_2O$  (**2-Co**) in 84% yield. In the case of copper, the addition of one equivalent of  $CuCl_2 \cdot 2H_2O$  to the tetrasodium salt **2** in water afforded a blue solution, whose treatment afforded a pure blue solid of  $\{Na_2[Cu(edts)]\} \cdot 4H_2O$  (**2-Cu**) in 80% yield. These complexes are air stable, slightly soluble in alcohols and DMSO, and soluble in water.

Finally, the addition of one equivalent of  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  in water to **2**, in this order, led to a white solid by-product, whose filtration and evaporation of the solution gives the white solid  $\{Na_2[Zn(edts)]\} \cdot 4H_2O$  (**2-Zn**). The similar solubility of this complex and  $Na_2SO_4$  precludes their separation. This derivative is air stable and soluble in water. The  $^1H$ -NMR spectrum of **2-Zn** shows that the two multiplets at  $\delta$  = 2.90 and 2.80 ppm for the methylene groups  $-CH_2CH_2SO_3Na$  in ligand **2** become a broad singlet at  $\delta$  = 3.11 ppm, while the clear singlet at  $\delta$  = 2.52 ppm for  $-NCH_2CH_2N-$  appears also as a broad singlet at  $\delta$  = 2.97 ppm. Respecting the  $^{13}C$ -NMR spectrum three resonances were observed at  $\delta$  = 49.5, 47.8 and 45.8 ppm, and assigned on the basis of HMQC experiments (see Experimental section). The presence of this set of signals implies a geometry in which each branch of each nitrogen atom would be involved in the metal coordination.

Treatment of **3** with one equiv. of  $NiBr_2 \cdot 3H_2O$  in water, 4 h at room temperature, afforded a green solution. After evaporation, the compound is extracted with EtOH, obtaining **3-Ni** without any by-product. The final green solid corresponds to  $[Ni(dmeddp)] \cdot 4H_2O$  (**3-Ni**) in 94% yield on the basis of quantitative analysis. In an analogous way, the reaction of **3** with one equiv. of  $CoCl_2 \cdot 2H_2O$  leads to a pink solid of stoichiometry  $[Co(dmeddp)] \cdot 4H_2O$  (**3-Co**) in 92% yield, and the reaction with one equiv. of  $CuCl_2 \cdot 2H_2O$  results in a blue solid of formulae  $[Cu(dmeddp)] \cdot 4H_2O$  (**3-Cu**) in 95% yield. These complexes are air stable compounds, soluble in water, alcohols and DMSO.

Finally, treatment of **4** with one equiv. of  $NiBr_2 \cdot 3H_2O$  in water, 4 h at room temperature, afforded a blue solution. After evaporation, the compound is extracted with EtOH, obtaining

**Scheme 2** Synthesis of the transition metal complexes.

**4-Ni** without any by-product. The final blue solid corresponds to  $\{\text{Na}_2[\text{Ni}(\text{edtp})]\} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (**4-Ni**) in 96% yield on the basis of quantitative analysis. Analogously, the reaction of **4** with one equiv. of  $\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  led to a pink solid, which is assigned to  $\{\text{Na}_2[\text{Co}(\text{edtp})]\} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (**4-Co**) in 93% yield, and the reaction with one equiv. of  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  gives rise to a blue solid of stoichiometry  $\{\text{Na}_2[\text{Cu}(\text{edtp})]\} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (**4-Cu**) in 96% yield. The complexes are air stable compounds, soluble in water, alcohols and DMSO.

**UV-Vis characterization.** All the nickel, cobalt and copper complexes were studied by UV-Vis spectrophotometry (Table 2).

**1-4-Ni** complexes are green, and present a band at 370–390 nm, assigned to a charge transfer band, which masks the  ${}^3\text{A}_{2g}(\text{F}) \rightarrow {}^3\text{T}_{1g}(\text{P})$  transition. In the Vis region, a band is observed at 620–660 nm from the  ${}^3\text{A}_{2g}(\text{F}) \rightarrow {}^3\text{T}_{1g}(\text{F})$  transition. Both of them have small extinction coefficient values (between  $1\text{--}30\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) and appear in the expected range. The last transition ( ${}^3\text{A}_{2g}(\text{F}) \rightarrow {}^3\text{T}_{2g}(\text{F})$ ), which should appear in the range 900–1200 nm, cannot be evaluated as it is out of range of measurement of the instrument used. These UV-Vis results, together with the mass spectroscopy study (see Experimental section), point to monomeric structures with an octahedral  $\text{N}_2\text{O}_4$  environment around the nickel atom, according to the literature.<sup>19,20</sup> Moreover, the barium analogous of **4-Ni**,  $\{\text{Ba}[\text{Ni}(\text{edtp})]\} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , described elsewhere,<sup>19</sup> shows a hexadentate  $\text{N}_2\text{O}_4$  structure in water solution, in a similar way as in analogous complexes of Co(III) and Cr(III) in solid state.<sup>18,19</sup> The octahedral coordination is also demonstrated by IR-FT studies, where the compounds exhibit only one strong IR band ( $1600\text{ cm}^{-1}$ ), corresponding to the coordinated carboxylates, but not the band at  $1700\text{ cm}^{-1}$ , due to a protonated carboxylate group.<sup>13,21,22</sup> A similar behaviour is observed for sulfonate derivatives, where a band around  $1650\text{ cm}^{-1}$  is observed. **1-4-Co** complexes are pink, and present a charge transfer band at 278 nm. The  ${}^4\text{T}_{1g}(\text{F})$

$\rightarrow {}^4\text{T}_{1g}(\text{P})$  transition appears around 480–510 nm, and the  ${}^4\text{T}_{1g}(\text{F}) \rightarrow {}^4\text{A}_{2g}(\text{F})$  transition in the range 510–590 nm. Both of them appear as low intensity ( $\epsilon = 1\text{--}20\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) wide bands, in the expected range. Again, the last transition ( ${}^4\text{T}_{1g}(\text{F}) \rightarrow {}^4\text{T}_{2g}(\text{F})$ ), in the range 1000–1250 nm, cannot be measured as described above. These UV-Vis data, which also point to an octahedral environment around the cobalt atom, are in agreement with the monomeric structures shown by the mass spectroscopy study (see Experimental section).

Finally, **1-4-Cu** complexes are blue, and present a charge transfer band between 275–290 nm, and only in the case of carboxylate complexes, a shoulder around 244 nm is observed, as well. One only d–d transition of high intensity is allowed by the spin rules, and it appears around 695 nm for **2-Cu** and **4-Cu**, both of them probably pseudooctahedral,<sup>19</sup> with  $\text{N}_2\text{O}_4$  environment around the copper atom. For **1-Cu**, X-ray diffraction studies showed the plane squared pyramid structure in solid state,<sup>10</sup> and in this case, the band is lower, at 684 nm, proving a little difference compared to **2-Cu**. In **3-Cu**, the band shifts to 663 nm, probably due to a distortion in the octahedral environment<sup>23–25</sup> from a dimeric structure (see mass spectroscopy data). This evidence is in agreement with the EPR results (see also later).

In all the copper compounds, the LMCT band around 280 nm is indicative of coordination through the ethylenediamine group. In the case of sulfonate complexes, this band is of low intensity in **2-Cu** respecting to **1-Cu**, indicating a weaker interaction with nitrogens, in favour of a stronger coordination with the sulfonate oxygens. As Fig. 1 shows, in carboxylate complexes this LMCT band is more intense, demonstrating a preferential N coordination to the carboxylate oxygens. Also, a shoulder around 250 nm appears, indicating the carboxylate group coordination to the copper ion. **4-Cu** presents a more intense shoulder, due to the four carboxylate groups instead of two for **3-Cu**. All these evidences are in agreement with the EPR results (see also later).

**Table 2** UV-Vis absorption (maximum values, and extinction coefficient data between brackets) of the complexes. Reference values: “ $\text{MO}_6$ ” (hexaquoocomplex), “ $\text{MN}_6$ ” ( $[\text{Ni}(\text{NH}_3)_6]^{2+}$ ,  $[\text{Cu}(\text{1-allylimidazole})_6]^{2+}$ )

LMCT-MLCT ${}^3\text{A}_{2g}(\text{F}) \rightarrow {}^3\text{T}_{1g}(\text{P})$ ${}^3\text{A}_{2g}(\text{F}) \rightarrow {}^3\text{T}_{1g}(\text{F})$ ${}^3\text{A}_{2g}(\text{F}) \rightarrow {}^3\text{T}_{2g}(\text{F})$	330–500 nm 330–500 nm 540–720 nm 900–1200 nm <sup>a</sup>	LMCT-MLCT ${}^4\text{T}_{1g}(\text{F}) \rightarrow {}^4\text{T}_{1g}(\text{P})$ ${}^4\text{T}_{1g}(\text{F}) \rightarrow {}^4\text{A}_{2g}(\text{F})$ ${}^4\text{T}_{1g}(\text{F}) \rightarrow {}^4\text{T}_{2g}(\text{F})$	250–350 nm 450–600 nm 500–800 nm 1000–1250 nm <sup>a</sup>	LMCT-MLCT ${}^2\text{E}_g \rightarrow {}^2\text{T}_{2g}$	200–300 nm 600–900 nm
“ $\text{NiO}_6$ ”	395 658	“ $\text{CoO}_6$ ”	— 515 625	“ $\text{CuO}_6$ ”	— 794
“ $\text{NiN}_6$ ”	354 571	“ $\text{CoN}_6$ ”	— 484–487 530–611	“ $\text{CuN}_6$ ”	— 578
<b>1-Ni</b>	390 (18,01) 670 (8,58)	<b>1-Co</b>	— 500 (20,28) 705 (13,93)	<b>1-Cu</b>	278 (3770) 684 (73,05)
<b>2-Ni</b>	388 (23,26) 660 (8,51)	<b>2-Co</b>	278 (90,97) 480sh 513 (8,69)	<b>2-Cu</b>	286 (2235) 693 (65,09)
<b>3-Ni</b>	376 (8,20) 628 (5,89)	<b>3-Co</b>	508 (7,94)	<b>3-Cu</b>	250sh, 276 (3485)
<b>4-Ni</b>	377 (63,02) 622 (31,79)	<b>4-Co</b>	— 508 (94,65) 586sh (51,61)	<b>4-Cu</b>	663 (113) 250sh, 282 (3978) 698 (154,4)

<sup>a</sup> indicates bands out of range of measurement for the instrument

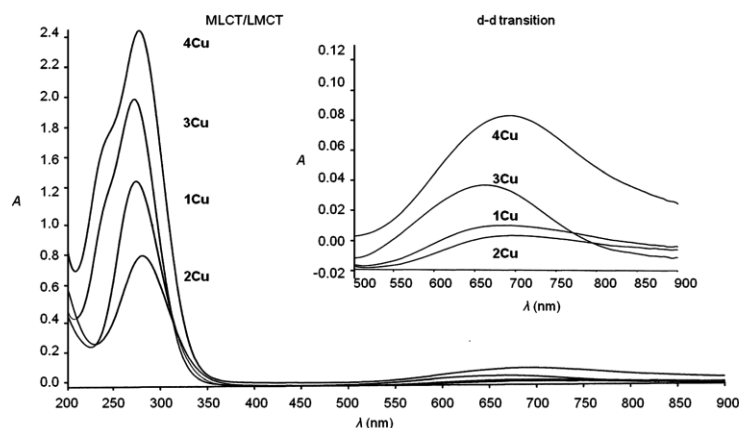


Fig. 1 Comparative UV-Vis spectra of the copper complexes **n-Cu**, (**n** = 1, 2, 3, 4), at 0.5 mM.

**EPR characterization.** The EPR technique has been used to investigate the geometry and structure of the **n-Cu** complexes in solution. Fig. 2 shows the experimental and the computed (see the Experimental section for computation details) EPR spectra of **n-Cu** complexes at room (298 K) and low (150 K) temperatures. Table 3 lists the main parameters used for computations, at different molar ratio  $L : Cu^{2+}$ ,  $[L] = 0.05$  M. To interpret these parameters, we mainly refer to previous literature where the EPR analysis was performed by means of a similar approach.<sup>26–29</sup>

Mainly, we have to consider that an increase of  $A_{zz}$  and the correspondent decrease of  $g_{zz}$  indicate an increased electron density on the copper nuclei, due to: (i) an increased number of nitrogen sites with respect to oxygen sites coordinating the copper ions (nitrogen nucleus is transferring the electron density onto the copper nucleus more efficiently than the negatively charged oxygens); (ii) an increasing strength of interaction with negatively charged oxygen groups. If both  $g_{zz}$  and  $A_{zz}$  parameters decrease, we interpret these results with a distortion in the square planar coordination.

Hence, at copper concentration of 0.01 M (molar ratio 1 : 0.2 between the ligand and the copper ion) the EPR spectrum of **1-Cu** is characteristic of  $Cu^{2+}$  interacting with 2 nitrogens and 2 oxygen sites. In **2-Cu** only 20% of the ions have this coordination, but 80% of the ions show parameters suggestive of a  $CuO_4$  coordination, in line with a higher number of sulfonate groups which bind copper ions instead of the nitrogen sites. This result is in agreement with that obtained from UV-Vis experiments.

For carboxylate ligands, the interaction with the negatively charged oxygen groups is weaker with respect to the sulfonate groups, and therefore we expect a preferential interaction with nitrogen sites when the carboxylate groups are present. In line with this expectation,  $A_{zz}$  increased, while  $g_{zz}$  decreased from **2-Cu** to **4-Cu**. However, an opposite trend was found for **3-Cu** with respect to **1-Cu** (decrease in  $A_{zz}$  and increase in  $g_{zz}$  for **3-Cu**, but  $\langle A \rangle$  increases too). The magnetic and mobility parameters of **3-Cu** indicate a distorted  $CuN_1O_3$  coordination: this

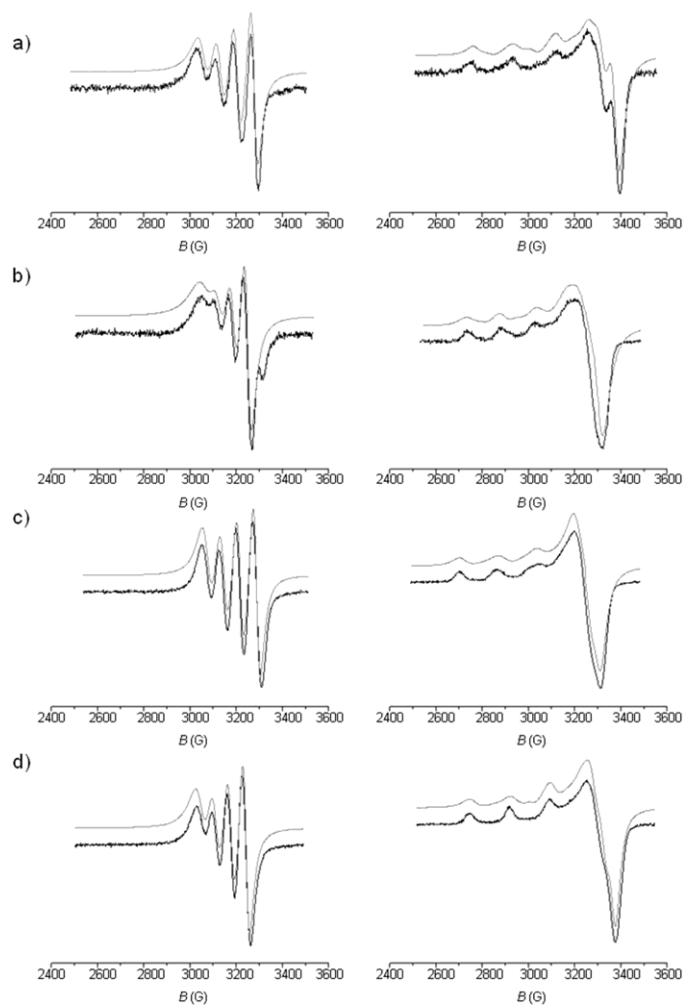
probably arises from the formation of a dimeric structure, as the mass spectroscopy pointed out, where both of the two copper ions weakly interact with two **3** ligands. Indeed, the fastest mobility (lowest  $\tau$  value) of **3-Cu** at room temperature is in line with this interpretation.

As copper concentration is increased, the nitrogen sites get quickly saturated, and only the oxygen sites become available, therefore  $A_{zz}$  decreases and  $g_{zz}$  increases. Moreover, a broad single-line signal superimposes to the resolved signal and progressively increases its relative percentage. Such a broad signal arises from the progressive saturation of the oxygen sites with forces the  $Cu^{2+}$  ions to occupy close positions. The graph in Fig. 3 shows the increase in the relative percentage of the broad signal as a function of copper concentration. The weakly coordinated **3** shows a delayed saturation, in agreement with the formation of distorted dimeric Cu-complexes which disfavors the apparition of the broad signal.

#### Biological assays

Compounds from family **1** have been previously evaluated in MT-2 (human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1)-infected cell line) cells for an inhibitory effect. They were shown to be non-toxic under 5  $\mu$ M concentrations, and have an inhibitory activity both at pre-treatment as at post-treatment.<sup>10</sup> In this study, the established MT-2 cell line has been changed to the primary culture PBMC (peripheral blood mononuclear cells) isolated from healthy donors blood, as they appear to be more physiological, and we can evaluate the compound action in a more real situation.

**Biocompatibility assay.** Complexes derived from compounds **2**, **3** and **4** were tested on PBMC for a toxic effect using a well-established metabolic activity assay (MTT) in the range 0.5 to 5  $\mu$ M at 24 h (see the ESI†). The study underlines the absence of toxicity of these compounds below 5  $\mu$ M concentrations in the PBMC cultures.  $NiBr_2$  and  $CoCl_2$  are in the established limit for



**Fig. 2** EPR spectra at a ratio ligand : Cu of 1 : 0.2, at room (298 K, left column) and low (150 K, right column) temperatures; black experimental spectra, gray computed spectra. (a) **1-Cu**; (b) **2-Cu**; (c) **3-Cu**; (d) **4-Cu**.

**Table 3** Main parameters used for the computation of the EPR spectra

Ligand	Molar Ratio L : Cu <sup>2+</sup>	$A_{zz}$ (G)	$g_{zz}$	$\langle A \rangle$ (G)	$\langle g \rangle$	$\tau$ ( $\times 10^{-11}$ s)	Ref.
<b>1</b>	1 : 0.2	176	2.241	71.0	2.107	5.27	(10)
	1 : 0.5	166	2.260	62.0	2.143	10.5	(10)
<b>2</b>	1 : 0.2–80%	152	2.284	60.5	2.157	7.11	This work
	1 : 0.2–20%	176	2.241	71.0	2.107	5.27	This work
<b>3</b>	1 : 0.2	168	2.265	72.0	2.117	3.48	This work
<b>4</b>	1 : 0.2	170	2.257	66.4	2.116	4.92	This work

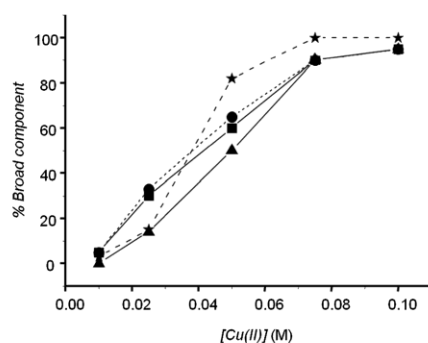


Fig. 3 Increase of the % of a broad component in the EPR spectra while increasing copper concentration, arising from the progressive saturation of the oxygen ligand sites. 1 (squares), 2 (circles), 3 (triangles), 4 (stars); [ligand] = 0.05 M.

biocompatibility (80% of mitochondrial activity), while all the complexes show values over 95%. The absence of toxicity remains after 72 h.

**HIV inhibition assays.** All the compounds have been evaluated for HIV antiviral activity. To discriminate between a putative effect attributed to the non-complexed metal ion and that of the complex itself, the inhibitory efficiencies of the complexes and the metal salts  $\text{NiBr}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{CuCl}_2$  and  $\text{ZnSO}_4$ , were compared under the same experimental conditions.

At first, pre-treatment of the PBMC with the compounds prior to HIV infection were studied (preventive behavior). PBMC were seeded ( $10^5$  cells/200  $\mu\text{L}$  of culture medium) and then incubated with compounds 5  $\mu\text{M}$  for 2 h. Afterwards, these PBMC were infected for 2 h with  $10\text{ ng}/10^6$  cells with HIV-1 NL4.3 strain and after 48 h, the supernatant was collected and the production of antigen p24 was measured by ELISA. The results are shown in Fig. 4a. None of the metal controls (black bars) display a statistically significant inhibition compared with mock treated

cells (ct+). The maximum inhibition is accomplished by T-20 (56%), using a concentration (15  $\mu\text{M}$ ) which is three times higher than that of the complexes (5  $\mu\text{M}$ ). Considering the results from the complexes with a low starting concentration in the biological experiments, some complexes present an interesting inhibition, in the T-20 range: nickel complexes inhibit 20–40%, 3-Co (37%) and 2-Zn (46%). All of them are statistically significant compared with ct+ and their metal controls. These evidences indicate that they are acting as inhibitors of the first step of the virus cycle.

However, little HIV inhibition was observed when the PBMC were pre-treated with 5  $\mu\text{M}$  of 2-Na, 3-Na or 4-Na compared with mock treated PBMC. This fact reveals that the ligands are almost inactive in their sodium salt form.

To check whether the compounds have any specificity on CCR5 and CXCR4 co-receptors, the same experiment was repeated with BaL HIV-1 strain, and the results are shown in Fig. 4b, compared to those of the HIV-1 NL4.3 strain. Some of the complexes seem to present certain specificity to act on CXCR4 co-receptor, such as 2-Ni, 3-Ni and 3-Co; others, on CCR5 co-receptor, such as 2-Cu and 4-Na; and some of them on both, such as 2-Zn or 4-Ni.

In the second experiment, PBMC were first infected for 2 h with  $10\text{ ng}/10^6$  cells of HIV-1 NL4.3 strain, and then treated with 5  $\mu\text{M}$  of the compounds for 24, 48 and 72 h at 37  $^\circ\text{C}$  and 5%  $\text{CO}_2$ , after which the supernatant was collected and the production of Ag p24 was measured (therapeutic behavior, see Fig. 5).

At 24 h, most of the compounds present a significant inhibition, higher than their respective metal controls, and in the range of AZT 1  $\mu\text{M}$  (about 50%). At this time, the metal complexes afford some degree of inhibition, unlike the sodium salts alone (data not shown), which indicates that the presence of the metal ion coordinated to the ligand is necessary to produce an inhibitory effect, and that the ligand enhances the inhibitory effect of the metal ion alone. However, at 48 h, all the metal controls inhibit very well (from 60% to 94%, similar values to AZT in the case of cobalt). Cobalt and copper complexes continue showing an interesting inhibition, about 60–80% and 30–40% respectively, but less than the metal alone. Finally, at 72 h, most

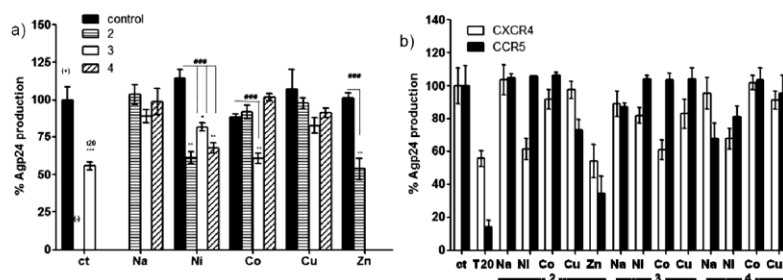
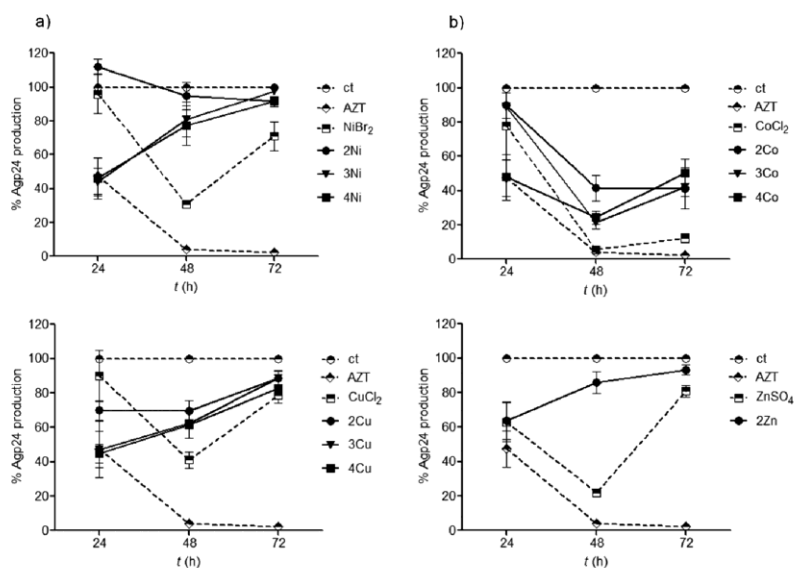


Fig. 4 ELISA assay for the HIV-1 core protein p24 production at 48 h pre-treatment. (a) HIV-1 NL4.3 strain. Black bars in the metal groups are the controls ( $\text{NiBr}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{CuCl}_2$  and  $\text{ZnSO}_4$ ). Differences from the ct(+) group were statistically analyzed ( $^{\circ}p < 0.2$ ,  $^{**}p < 0.05$ ,  $^{***}p < 0.01$ ), and also from the metal controls ( $^{###}p < 0.01$ ). (b) HIV-1 NL4.3 strain (white bars) and Bal strain (black bars) shows the specificity of some compounds for these co-receptors. The results are the mean of three different experiments. As a positive control of the viral inhibition, T-20 (fusion inhibitor, 15  $\mu\text{M}$ ) was used. All compounds were used at 5  $\mu\text{M}$ .





**Fig. 5** ELISA assay for the viral protein p24 antigen at 24, 48 and 72 h post-treatment. The results are the mean of four different experiments. As positive controls of the viral inhibition AZT (inhibitor of retrotranscription) at a concentration of 0.5  $\mu\text{M}$  (24 h) and 1  $\mu\text{M}$  (48 and 72 h) was used. (a) Nickel compounds. (b) Cobalt compounds. (c) Copper compounds. (d) Zinc compounds. All compounds were used at 5  $\mu\text{M}$ .

of the tested compounds show a poor effect, just  $\text{CoCl}_2$  (88%) and their complexes (50–60%) present a remarkable inhibition.

The stability of the compounds was checked in samples kept both in solution and solid state. Over dissolved samples, it was performed a post-treatment inhibition assay, with fresh and two month old solutions of the compounds. Stability of samples kept in the solid state, was also checked by UV-Vis spectrophotometry (data not shown), after dissolving them previously to register the spectra. In both cases, the results remained the same, confirming that all the compounds are stable both in solid state and in solution for long periods of time.

The ligands, in their sodium salt form, scarcely produce any inhibition. In general, carboxylated complexes are more efficient than sulfonated ones. For Ni, Cu and Zn complexes, the maximum inhibition is accomplished at 24 h and their activity diminishes on increasing the exposition time, while for the Co complexes the maximum inhibition takes place at 48 h, and this effect is still maintained at 72 h.

These results again indicate that the ligand coordination to the metal centre enhances its inhibitory activity and confirm that the complexes are stable enough under the experimental conditions of the assay.

To analyze a possible synergic effect of the compounds with a commercial antiretroviral drug, the previous experiment was repeated at 24 and 48 h, treating the cells with a combination of each compound (5  $\mu\text{M}$ ) and AZT (1  $\mu\text{M}$ ). In this experiment, PBMC were first infected for 2 h with  $10 \text{ ng}/10^6$  cells of HIV-1 NL4.3 strain, and then treated with 5  $\mu\text{M}$  of the compounds and 1  $\mu\text{M}$  of AZT for 24 and 48 h at 37  $^\circ\text{C}$  and 5%  $\text{CO}_2$ , after which

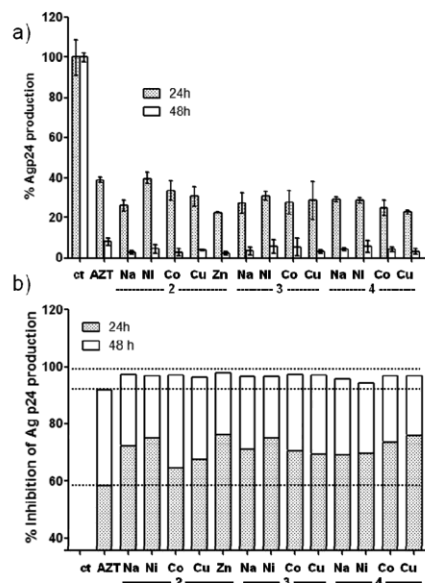
the supernatant was collected and the production of Ag p24 was measured (see Fig. 6).

Fig. 6a shows that at 24 h, the synergic effect is already observed, as all the compounds enhance the inhibition of AZT alone, up to 42% (**2-Zn**). Even the sodium salt forms of **2**, **3** and **4**, which don't produce any inhibition by themselves, increase about 30% of AZT inhibition. At 48 h, the synergic effect is still maintained, and AZT inhibition (92% compared to control) is enhanced to over 98% with most of the compounds. For a better observation, see Fig. 6b.

All these studies have been performed with the racemic mixture obtained for these complexes and we can not rule out that the different enantiomers may exhibit different biological activity.

## Conclusions

Some aminosulfonated and aminocarboxylated ligands have been prepared and used in the synthesis of transition metal complexes based on nickel, cobalt, copper and zinc. The ligands were characterized by means of NMR analysis, and potentiometric titration, whereas the complexes were characterized by means of UV-Vis, IR, mass spectroscopy, NMR (if diamagnetic) and EPR spectroscopy for the copper complexes. The EPR analysis indicated that, at a  $\text{Cu}/\text{L} = 0.2$  molar ratio, a  $\text{CuN}_2\text{O}_2$  coordination is formed from **1**, this coordination remains for 20% with **2**, but 80% of copper ions coordinate the 4 sulfonate groups ( $\text{CuO}_4$  coordination). Both **3** and **4** originate a  $\text{CuN}_1\text{O}_3$



**Fig. 6** Evaluation of the synergic effect of the compounds (5  $\mu$ M) and AZT (1  $\mu$ M) in HIV inhibition, followed by ELISA assay for the viral protein p24 antigen at 24 h (grey bars) and 48 h (white bars) post-treatment. (a) % of Ag p24 production. (b) % of inhibition of Ag p24 production. Values are referenced to infected cells used as control. As positive control of the viral inhibition, AZT 1  $\mu$ M was used.

coordination, but **3-Cu** shows a distorted geometry probably originated by a dimeric structure. At a 1 : 1 molar ratio the ligand sites are mostly saturated and a broad EPR signal predominates.

After showing their biocompatibility in PBMC, some of these complexes may constitute an interesting new class of antiviral agents. It is worth highlighting that the ligands in their sodium salt form **2**, **3** and **4**, as the core of the metallic complexes, are not toxic and barely have inhibitory effects against HIV, in both pre-infected and post-infected PBMC.

Some of the complexes show moderate or good (**2-Ni**, **2-Zn**, **3-Co**, **4-Ni**) anti-HIV activity in the pre-infected cell experiment, this feature may be indicative of an activity as fusion inhibitors. However, as it happened with family **1**, when the treatment was administrated after the cell HIV-infection, some of the compounds were also capable of inhibiting HIV replication, also pointing out that they may also act in subsequent steps of the replicative cycle. Using these complexes, the inhibitory effect is shorter (at 48 h they start losing their efficacy) but faster (at 24 h they are good inhibitors). Regarding the much lower toxicity than the metal salts, this could mean that higher doses could be used in order to achieve a greater effect.

This dual behaviour may be considered the greatest characteristic of these compounds, as they combine HIV preventive and therapeutic behaviour in only one single molecule.

In order to continue testing the synergic behaviour of metal ions and polyanionic ligands, work is in progress to extend this

study to metal complexes bonded to N-donor ligands containing dendritic polyanionic ligands in order to explore the multivalency (presence of multiple functional groups on the surface) as a property.

## Experimental

### General methods

Unless otherwise stated, reagents were obtained from commercial sources and used as received.  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  NMR spectra were recorded on Varian Unity VXR-300 and Varian 500 Plus Instruments. Chemical shifts ( $\delta$ , ppm) were measured relative to residual  $^1\text{H}$  for water- $\text{d}_2$  used as solvent. For  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  external references were used. C, H and N analyses were carried out with a Perkin-Elmer 240 C microanalyzer, and UV-Vis analyses with UV-Vis Spectrophotometer Perkin-Elmer Lambda 18. The potentiometric titrations were performed using a CRISON titration system consisting of a digital potentiometer (pH-Meter BASIC 20+) and a pH electrode, which has an encapsulated reference system (cartridge) with  $\text{Ag}^+$  ion barrier, two diaphragms and CRISOLYT electrolyte. The pH meter was standardized at pHs 4.01, 7.00 and 9.21 using the appropriate buffer solutions. IR spectra were obtained by a Perkin Elmer 883 spectrophotometer using KBr disks.

**Synthesis of  $[\text{Na}_4(\text{edts})]\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (**2**).** In an ampoule, ethylenediamine (2.00 ml, 29.6 mmol) and sodium vinylsulfonate (43.5 ml, 118.5 mmol) were mixed. The resulting solution was stirred for 24 h at 120  $^\circ\text{C}$  and then evaporated under reduced pressure. The resulting product was washed with MeOH ( $3 \times 5$  mL) and then with  $\text{Et}_2\text{O}$  ( $3 \times 5$  mL) and dried under vacuum to give **2** as a white water-soluble solid (19.3 g, 100%).  $\delta_{\text{H}}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ): 2.90 (8 H, t,  $-\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{Na}$ ), 2.80 (8 H, t,  $-\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{Na}$ ), 2.52 (4 H, s,  $-\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{N}-$ ).  $\delta_{\text{C}}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ): 50.0 ( $-\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{N}-$ ); 47.9 ( $-\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{Na}$ ), 47.0 ( $-\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{Na}$ ).

$\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{Na}_4\text{O}_{12}\text{S}_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (652,55): calcd. C, 18.41; H, 4.32; N, 4.29; found. C, 18.45; H, 3.47; N, 4.23.

**Synthesis of  $[\text{Na}_2\text{M}(\text{edts})]\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (**2-Ni**, **2-Co**, **2-Cu**).** To an aqueous solution (5 ml) of **2** (1.0 g, 1.53 mmol), another aqueous solution (2 ml) of  $\text{MX}_2$  [ $\text{NiBr}_2\cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (0.418 g, 1.53 mmol);  $\text{CoCl}_2\cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0.364 g, 1.53 mmol);  $\text{CuCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0.262 g, 1.53 mmol)] was added. The mixture was stirred for 4 h to assure the completion of the reaction, and the resulting product was filtered, reduced to half its volume, and precipitated with EtOH (1 : 4,  $\text{H}_2\text{O}$  : EtOH). After filtering and drying under vacuum, we obtained compounds **2-Ni**, **2-Co** and **2-Cu** as green/violet/light blue solids (794, 855, 820 mg; 78, 84, 80%).

(**2-Ni**)  $\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{Na}_2\text{NiO}_{12}\text{S}_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (665,26): calcd. C, 18.05; H, 4.24; N, 4.21; S, 19.28; found. C, 17.66; H, 4.36; N, 4.07; S, 19.63.  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\text{H}_2\text{O}$ ): 388 nm ( $23.26 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) and 660 nm ( $8.51 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

ESI(–):  $m/z$  calc.  $\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{NiO}_{12}\text{S}_4^-$  [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^-$ : 546.93 uma; exp, 546.93 uma.

(**2-Co**)  $\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{Na}_2\text{CoO}_{12}\text{S}_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (665,5): calcd. C, 18.05; H, 4.24; N, 4.21; S, 19.27; found. C, 17.50; H, 4.15; N, 4.28; S, 19.28.  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\text{H}_2\text{O}$ ): 278 nm ( $90.97 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), 480 s, and 513 nm ( $8.69 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

## ***8. BIBLIOGRAFÍA***



## 8. BIBLIOGRAFÍA



1. Gottlieb, M.S., *et al.* Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med* **305**, 1425-1431 (1981).
2. Barre-Sinoussi, F., *et al.* Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 868-871 (1983).
3. Reeves, J.D. & Doms, R.W. Human immunodeficiency virus type 2. *J Gen Virol* **83**, 1253-1265 (2002).
4. Daniel, M.D., *et al.* Isolation of T-cell tropic HTLV-III-like retrovirus from macaques. *Science* **228**, 1201-1204 (1985).
5. Clavel, F., *et al.* Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* **233**, 343-346 (1986).
6. Sharp, P.M., Shaw, G.M. & Hahn, B.H. Simian immunodeficiency virus infection of chimpanzees. *J Virol* **79**, 3891-3902 (2005).
7. Santiago, M.L., *et al.* Simian immunodeficiency virus infection in free-ranging sooty mangabeys (*Cercocebus atys atys*) from the Tai Forest, Cote d'Ivoire: implications for the origin of epidemic human immunodeficiency virus type 2. *J Virol* **79**, 12515-12527 (2005).
8. Price, R.W., *et al.* The brain in AIDS: central nervous system HIV-1 infection and AIDS dementia complex. *Science* **239**, 586-592 (1988).
9. das Neves, J., Amiji, M. & Sarmiento, B. Mucoadhesive nanosystems for vaginal microbicide development: friend or foe? *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* **3**, 389-399 (2011).
10. Mamo, T., *et al.* Emerging nanotechnology approaches for HIV/AIDS treatment and prevention. *Nanomedicine (Lond)* **5**, 269-285 (2010).
11. Harrigan, P.R., *et al.* Predictors of HIV drug-resistance mutations in a large antiretroviral-naïve cohort initiating triple antiretroviral therapy. *J Infect Dis* **191**, 339-347 (2005).
12. Chun, T.W., Davey, R.T., Jr., Engel, D., Lane, H.C. & Fauci, A.S. Re-emergence of HIV after stopping therapy. *Nature* **401**, 874-875 (1999).
13. Marsden, M.D. & Zack, J.A. Eradication of HIV: current challenges and new directions. *J Antimicrob Chemother* **63**, 7-10 (2009).
14. Richman, D.D., *et al.* The challenge of finding a cure for HIV infection. *Science* **323**, 1304-1307 (2009).
15. Nelson, M., *et al.* Combination antiretroviral therapy toxicities: a comparison between patients and health care professionals. *J Acquir Immune Defic Syndr* **56**, e120-121 (2011).
16. Johnson, M.O., Dilworth, S.E., Taylor, J.M. & Neilands, T.B. Improving coping skills for self-management of treatment side effects can reduce antiretroviral medication nonadherence among people living with HIV. *Ann Behav Med* **41**, 83-91 (2011).

17. Senise, J.F., Castelo, A. & Martinez, M. Current treatment strategies, complications and considerations for the use of HIV antiretroviral therapy during pregnancy. *AIDS Rev* **13**, 198-213 (2011).
18. Palmer, S., Josefsson, L. & Coffin, J.M. HIV reservoirs and the possibility of a cure for HIV infection. *J Intern Med* **270**, 550-560 (2011).
19. Politch, J.A., *et al.* Highly active antiretroviral therapy does not completely suppress HIV in semen of sexually active HIV-infected men who have sex with men. *AIDS* (2012).
20. Clarke, J.R., Williamson, J.D. & Mitchell, D.M. Comparative study of the isolation of human immunodeficiency virus from the lung and peripheral blood of AIDS patients. *J Med Virol* **39**, 196-199 (1993).
21. Frankel, A.D. & Young, J.A. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem* **67**, 1-25 (1998).
22. Gorry, P.R. & Ancuta, P. Coreceptors and HIV-1 pathogenesis. *Curr HIV/AIDS Rep* **8**, 45-53 (2011).
23. Lin, N.H. & Kuritzkes, D.R. Tropism testing in the clinical management of HIV-1 infection. *Curr Opin HIV AIDS* **4**, 481-487 (2009).
24. Clementi, M. & Lazzarin, A. Human immunodeficiency virus type 1 fitness and tropism: concept, quantification, and clinical relevance. *Clin Microbiol Infect* **16**, 1532-1538 (2010).
25. Popov, S., *et al.* Viral protein R regulates nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex. *EMBO J* **17**, 909-917 (1998).
26. Bukrinsky, M.I., Stanwick, T.L., Dempsey, M.P. & Stevenson, M. Quiescent T lymphocytes as an inducible virus reservoir in HIV-1 infection. *Science* **254**, 423-427 (1991).
27. Nabel, G. & Baltimore, D. An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells. *Nature* **326**, 711-713 (1987).
28. Henderson, L.E., *et al.* Gag proteins of the highly replicative MN strain of human immunodeficiency virus type 1: posttranslational modifications, proteolytic processings, and complete amino acid sequences. *J Virol* **66**, 1856-1865 (1992).
29. Shattock, R.J. & Moore, J.P. Inhibiting sexual transmission of HIV-1 infection. *Nat Rev Microbiol* **1**, 25-34 (2003).
30. Miller, C.J. & Shattock, R.J. Target cells in vaginal HIV transmission. *Microbes Infect* **5**, 59-67 (2003).
31. Quinn, T.C., *et al.* Viral load and heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. Rakai Project Study Group. *N Engl J Med* **342**, 921-929 (2000).
32. Gray, R.H., *et al.* Probability of HIV-1 transmission per coital act in monogamous, heterosexual, HIV-1-discordant couples in Rakai, Uganda. *Lancet* **357**, 1149-1153 (2001).
33. Eron, J.J., Jr., *et al.* The effects of protease inhibitor therapy on human immunodeficiency virus type 1 levels in semen (AIDS clinical trials group protocol 850). *J Infect Dis* **181**, 1622-1628 (2000).
34. Cu-Uvin, S., *et al.* Effect of highly active antiretroviral therapy on cervicovaginal HIV-1 RNA. *AIDS* **14**, 415-421 (2000).

35. Tachet, A., *et al.* Detection and quantification of HIV-1 in semen: identification of a subpopulation of men at high potential risk of viral sexual transmission. *AIDS* **13**, 823-831 (1999).
36. Kalichman, S.C., *et al.* Human immunodeficiency virus in semen and plasma: investigation of sexual transmission risk behavioral correlates. *AIDS Res Hum Retroviruses* **17**, 1695-1703 (2001).
37. Tebit, D.M., Ndembu, N., Weinberg, A. & Quinones-Mateu, M.E. Mucosal transmission of human immunodeficiency virus. *Curr HIV Res* **10**, 3-8 (2012).
38. Bomsel, M. & David, V. Mucosal gatekeepers: selecting HIV viruses for early infection. *Nat Med* **8**, 114-116 (2002).
39. Hladik, F. & McElrath, M.J. Setting the stage: host invasion by HIV. *Nat Rev Immunol* **8**, 447-457 (2008).
40. Shattock, R.J., Griffin, G.E. & Gorodeski, G.I. In vitro models of mucosal HIV transmission. *Nat Med* **6**, 607-608 (2000).
41. Howell, A.L., *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 infection of cells and tissues from the upper and lower human female reproductive tract. *J Virol* **71**, 3498-3506 (1997).
42. Kell, P.D., Barton, S.E., Edmonds, D.K. & Boag, F.C. HIV infection in a patient with Meyer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome. *J R Soc Med* **85**, 706-707 (1992).
43. Miller, C.J., Alexander, N.J., Vogel, P., Anderson, J. & Marx, P.A. Mechanism of genital transmission of SIV: a hypothesis based on transmission studies and the location of SIV in the genital tract of chronically infected female rhesus macaques. *J Med Primatol* **21**, 64-68 (1992).
44. Padian, N.S., *et al.* Diaphragm and lubricant gel for prevention of HIV acquisition in southern African women: a randomised controlled trial. *Lancet* **370**, 251-261 (2007).
45. Joag, S.V., *et al.* Animal model of mucosally transmitted human immunodeficiency virus type 1 disease: intravaginal and oral deposition of simian/human immunodeficiency virus in macaques results in systemic infection, elimination of CD4+ T cells, and AIDS. *J Virol* **71**, 4016-4023 (1997).
46. Marx, P.A., *et al.* Progesterone implants enhance SIV vaginal transmission and early virus load. *Nat Med* **2**, 1084-1089 (1996).
47. Smith, S.M., Baskin, G.B. & Marx, P.A. Estrogen protects against vaginal transmission of simian immunodeficiency virus. *J Infect Dis* **182**, 708-715 (2000).
48. Kaizu, M., *et al.* Repeated intravaginal inoculation with cell-associated simian immunodeficiency virus results in persistent infection of nonhuman primates. *J Infect Dis* **194**, 912-916 (2006).
49. Khanna, K.V., *et al.* Vaginal transmission of cell-associated HIV-1 in the mouse is blocked by a topical, membrane-modifying agent. *J Clin Invest* **109**, 205-211 (2002).
50. Zhu, T., *et al.* Genetic characterization of human immunodeficiency virus type 1 in blood and genital secretions: evidence for viral compartmentalization and selection during sexual transmission. *J Virol* **70**, 3098-3107 (1996).
51. Gupta, P., *et al.* Memory CD4(+) T cells are the earliest detectable human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected cells in the female genital mucosal tissue during HIV-1 transmission in an organ culture system. *J Virol* **76**, 9868-9876 (2002).

52. Zussman, A., Lara, L., Lara, H.H., Bentwich, Z. & Borkow, G. Blocking of cell-free and cell-associated HIV-1 transmission through human cervix organ culture with UC781. *AIDS* **17**, 653-661 (2003).
53. Maher, D., Wu, X., Schacker, T., Horbul, J. & Southern, P. HIV binding, penetration, and primary infection in human cervicovaginal tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 11504-11509 (2005).
54. Miller, C.J., *et al.* Propagation and dissemination of infection after vaginal transmission of simian immunodeficiency virus. *J Virol* **79**, 9217-9227 (2005).
55. Dezzutti, C.S., *et al.* Cervical and prostate primary epithelial cells are not productively infected but sequester human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis* **183**, 1204-1213 (2001).
56. Wu, Z., Chen, Z. & Phillips, D.M. Human genital epithelial cells capture cell-free human immunodeficiency virus type 1 and transmit the virus to CD4+ Cells: implications for mechanisms of sexual transmission. *J Infect Dis* **188**, 1473-1482 (2003).
57. Berlier, W., *et al.* Selective sequestration of X4 isolates by human genital epithelial cells: Implication for virus tropism selection process during sexual transmission of HIV. *J Med Virol* **77**, 465-474 (2005).
58. Bobardt, M.D., *et al.* Cell-free human immunodeficiency virus type 1 transcytosis through primary genital epithelial cells. *J Virol* **81**, 395-405 (2007).
59. Alfsen, A., Yu, H., Magerus-Chatinet, A., Schmitt, A. & Bomsel, M. HIV-1-infected blood mononuclear cells form an integrin- and agrin-dependent viral synapse to induce efficient HIV-1 transcytosis across epithelial cell monolayer. *Mol Biol Cell* **16**, 4267-4279 (2005).
60. Van Herrewege, Y., *et al.* A dual chamber model of female cervical mucosa for the study of HIV transmission and for the evaluation of candidate HIV microbicides. *Antiviral Res* **74**, 111-124 (2007).
61. Phillips, D.M., Tan, X., Perotti, M.E. & Zacharopoulos, V.R. Mechanism of monocyte-macrophage-mediated transmission of HIV. *AIDS Res Hum Retroviruses* **14 Suppl 1**, S67-70 (1998).
62. Greenhead, P., *et al.* Parameters of human immunodeficiency virus infection of human cervical tissue and inhibition by vaginal virucides. *J Virol* **74**, 5577-5586 (2000).
63. Pope, M. & Haase, A.T. Transmission, acute HIV-1 infection and the quest for strategies to prevent infection. *Nat Med* **9**, 847-852 (2003).
64. Hu, J., Gardner, M.B. & Miller, C.J. Simian immunodeficiency virus rapidly penetrates the cervicovaginal mucosa after intravaginal inoculation and infects intraepithelial dendritic cells. *J Virol* **74**, 6087-6095 (2000).
65. Nishibu, A., *et al.* Behavioral responses of epidermal Langerhans cells in situ to local pathological stimuli. *J Invest Dermatol* **126**, 787-796 (2006).
66. Miller, C.J., McChesney, M. & Moore, P.F. Langerhans cells, macrophages and lymphocyte subsets in the cervix and vagina of rhesus macaques. *Lab Invest* **67**, 628-634 (1992).
67. Edwards, J.N. & Morris, H.B. Langerhans' cells and lymphocyte subsets in the female genital tract. *Br J Obstet Gynaecol* **92**, 974-982 (1985).



68. Hladik, F., Lentz, G., Delpit, E., McElroy, A. & McElrath, M.J. Coexpression of CCR5 and IL-2 in human genital but not blood T cells: implications for the ontogeny of the CCR5+ Th1 phenotype. *J Immunol* **163**, 2306-2313 (1999).
69. Hladik, F., *et al.* Initial events in establishing vaginal entry and infection by human immunodeficiency virus type-1. *Immunity* **26**, 257-270 (2007).
70. Zhang, L., *et al.* In vivo distribution of the human immunodeficiency virus/simian immunodeficiency virus coreceptors: CXCR4, CCR3, and CCR5. *J Virol* **72**, 5035-5045 (1998).
71. Prakash, M., Kapembwa, M.S., Gotch, F. & Patterson, S. Higher levels of activation markers and chemokine receptors on T lymphocytes in the cervix than peripheral blood of normal healthy women. *J Reprod Immunol* **52**, 101-111 (2001).
72. Hu, Q., *et al.* Blockade of attachment and fusion receptors inhibits HIV-1 infection of human cervical tissue. *J Exp Med* **199**, 1065-1075 (2004).
73. Ganor, Y. & Bomsel, M. HIV-1 transmission in the male genital tract. *Am J Reprod Immunol* **65**, 284-291 (2011).
74. McCoombe, S.G. & Short, R.V. Potential HIV-1 target cells in the human penis. *AIDS* **20**, 1491-1495 (2006).
75. Patterson, B.K., *et al.* Susceptibility to human immunodeficiency virus-1 infection of human foreskin and cervical tissue grown in explant culture. *Am J Pathol* **161**, 867-873 (2002).
76. Donoval, B.A., *et al.* HIV-1 target cells in foreskins of African men with varying histories of sexually transmitted infections. *Am J Clin Pathol* **125**, 386-391 (2006).
77. Meier, A.S., Bukusi, E.A., Cohen, C.R. & Holmes, K.K. Independent association of hygiene, socioeconomic status, and circumcision with reduced risk of HIV infection among Kenyan men. *J Acquir Immune Defic Syndr* **43**, 117-118 (2006).
78. Gray, R.H., *et al.* Male circumcision for HIV prevention in men in Rakai, Uganda: a randomised trial. *Lancet* **369**, 657-666 (2007).
79. Quinn, T.C. Circumcision and HIV transmission. *Curr Opin Infect Dis* **20**, 33-38 (2007).
80. Anderson, D., Politch, J.A. & Pudney, J. HIV infection and immune defense of the penis. *Am J Reprod Immunol* **65**, 220-229 (2011).
81. McClure, C.P., *et al.* HIV coreceptor and chemokine ligand gene expression in the male urethra and female cervix. *AIDS* **19**, 1257-1265 (2005).
82. Yeh, W.W., *et al.* The TRIM5 gene modulates penile mucosal acquisition of simian immunodeficiency virus in rhesus monkeys. *J Virol* **85**, 10389-10398 (2011).
83. Krieger, J.N., *et al.* Vasectomy and human immunodeficiency virus type 1 in semen. *J Urol* **159**, 820-825; discussion 825-826 (1998).
84. Pudney, J., Oneta, M., Mayer, K., Seage, G., 3rd & Anderson, D. Pre-ejaculatory fluid as potential vector for sexual transmission of HIV-1. *Lancet* **340**, 1470 (1992).
85. Veldhuijzen, N.J., *et al.* Anal intercourse among female sex workers in East Africa is associated with other high-risk behaviours for HIV. *Sex Health* **8**, 251-254 (2011).
86. Kalichman, S.C., Simbayi, L.C., Cain, D. & Jooste, S. Heterosexual anal intercourse among community and clinical settings in Cape Town, South Africa. *Sex Transm Infect* **85**, 411-415 (2009).
87. McGowan, I. Rectal microbicides: can we make them and will people use them? *AIDS Behav* **15 Suppl 1**, S66-71 (2011).

88. Garcia-Lerma, J.G., *et al.* Prevention of rectal SHIV transmission in macaques by daily or intermittent prophylaxis with emtricitabine and tenofovir. *PLoS Med* **5**, e28 (2008).
89. Cerf-Bensussan, N. & Guy-Grand, D. Intestinal intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterol Clin North Am* **20**, 549-576 (1991).
90. Ribeiro Dos Santos, P., *et al.* Rapid dissemination of SIV follows multisite entry after rectal inoculation. *PLoS One* **6**, e19493 (2011).
91. Farokhzad, O.C. Nanotechnology for drug delivery: the perfect partnership. *Expert Opin Drug Deliv* **5**, 927-929 (2008).
92. Zhang, L., *et al.* Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. *Clin Pharmacol Ther* **83**, 761-769 (2008).
93. Ferrari, M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nat Rev Cancer* **5**, 161-171 (2005).
94. Nie, S., Xing, Y., Kim, G.J. & Simons, J.W. Nanotechnology applications in cancer. *Annu Rev Biomed Eng* **9**, 257-288 (2007).
95. Heath, J.R. & Davis, M.E. Nanotechnology and cancer. *Annu Rev Med* **59**, 251-265 (2008).
96. Kudgus, R.A., Bhattacharya, R. & Mukherjee, P. Cancer nanotechnology: emerging role of gold nanoconjugates. *Anticancer Agents Med Chem* **11**, 965-973 (2011).
97. Schroeder, A., *et al.* Treating metastatic cancer with nanotechnology. *Nat Rev Cancer* **12**, 39-50 (2012).
98. Mallipeddi, R. & Rohan, L.C. Progress in antiretroviral drug delivery using nanotechnology. *Int J Nanomedicine* **5**, 533-547 (2010).
99. Boyapalle, S. & Mohapatra, S. Nanotechnology Applications to HIV Vaccines and Microbicides. *J Glob Infect Dis* **4**, 62-68 (2012).
100. Rao, K.S., Ghorpade, A. & Labhasetwar, V. Targeting anti-HIV drugs to the CNS. *Expert Opin Drug Deliv* **6**, 771-784 (2009).
101. Lara, H.H., Garza-Trevino, E.N., Ixtapan-Turrent, L. & Singh, D.K. Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and virucidal compounds. *J Nanobiotechnology* **9**, 30 (2011).
102. Garcia-Gallego, S., *et al.* Polyanionic N-donor ligands as chelating agents in transition metal complexes: synthesis, structural characterization and antiviral properties against HIV. *Dalton Trans* (2012).
103. Peek, L.J., Middaugh, C.R. & Berkland, C. Nanotechnology in vaccine delivery. *Adv Drug Deliv Rev* **60**, 915-928 (2008).
104. Chonco, L., *et al.* Carbosilane dendrimer nanotechnology outlines of the broad HIV blocker profile. *J Control Release* (2012).
105. Galan, M., *et al.* Antiviral properties against HIV of water soluble copper carbosilane dendrimers and their EPR characterization. *Curr Med Chem* (2012).
106. Farokhzad, O.C. & Langer, R. Impact of nanotechnology on drug delivery. *ACS Nano* **3**, 16-20 (2009).
107. Mukerjee, A., Ranjan, A.P. & Vishwanatha, J.K. Combinatorial Nanoparticles for Cancer Diagnosis and Therapy. *Curr Med Chem* (2012).
108. Rosenholm, J.M., Mamaeva, V., Sahlgren, C. & Linden, M. Nanoparticles in targeted cancer therapy: mesoporous silica nanoparticles entering preclinical development stage. *Nanomedicine (Lond)* **7**, 111-120 (2012).

109. das Neves, J., Amiji, M.M., Bahia, M.F. & Sarmento, B. Nanotechnology-based systems for the treatment and prevention of HIV/AIDS. *Adv Drug Deliv Rev* **62**, 458-477 (2010).
110. Sharma, P. & Garg, S. Pure drug and polymer based nanotechnologies for the improved solubility, stability, bioavailability and targeting of anti-HIV drugs. *Adv Drug Deliv Rev* **62**, 491-502 (2010).
111. Youns, M., Hoheisel, J.D. & Efferth, T. Therapeutic and diagnostic applications of nanoparticles. *Curr Drug Targets* **12**, 357-365 (2011).
112. Kovochich, M., Marsden, M.D. & Zack, J.A. Activation of latent HIV using drug-loaded nanoparticles. *PLoS One* **6**, e18270 (2011).
113. Wong, H.L., Chattopadhyay, N., Wu, X.Y. & Bendayan, R. Nanotechnology applications for improved delivery of antiretroviral drugs to the brain. *Adv Drug Deliv Rev* **62**, 503-517 (2010).
114. Parboosing, R., Maguire, G.E., Govender, P. & Kruger, H.G. Nanotechnology and the Treatment of HIV Infection. *Viruses* **4**, 488-520 (2012).
115. Mahajan, S.D., *et al.* Nanoparticle-mediated targeted delivery of antiretrovirals to the brain. *Methods Enzymol* **509**, 41-60 (2012).
116. Kim, B.Y., Rutka, J.T. & Chan, W.C. Nanomedicine. *N Engl J Med* **363**, 2434-2443 (2010).
117. Phillips, N.C. & Tsoukas, C. Liposomal encapsulation of azidothymidine results in decreased hematopoietic toxicity and enhanced activity against murine acquired immunodeficiency syndrome. *Blood* **79**, 1137-1143 (1992).
118. Kim, P.S. & Read, S.W. Nanotechnology and HIV: potential applications for treatment and prevention. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* **2**, 693-702 (2010).
119. Choi, S.U., Bui, T. & Ho, R.J. pH-dependent interactions of indinavir and lipids in nanoparticles and their ability to entrap a solute. *J Pharm Sci* **97**, 931-943 (2008).
120. Dutta, T., Jain, N.K., McMillan, N.A. & Parekh, H.S. Dendrimer nanocarriers as versatile vectors in gene delivery. *Nanomedicine* **6**, 25-34 (2010).
121. Jimenez, J.L., *et al.* Carbosilane dendrimers to transfect human astrocytes with small interfering RNA targeting human immunodeficiency virus. *BioDrugs* **24**, 331-343 (2010).
122. Shcharbin, D., *et al.* Carbosilane dendrimers NN8 and NN16 form a stable complex with siGAG1. *Colloids Surf B Biointerfaces* **83**, 388-391 (2011).
123. Pedziwiatr-Werbicka, E., *et al.* Carbosilane dendrimers are a non-viral delivery system for antisense oligonucleotides: characterization of dendriplexes. *J Biomed Nanotechnol* **8**, 57-73 (2012).
124. Ciepluch, K., *et al.* Biological properties of new viologen-phosphorus dendrimers. *Mol Pharm* **9**, 448-457 (2012).
125. Hobel, S., *et al.* Maltose- and maltotriose-modified, hyperbranched poly(ethylene imine)s (OM-PEIs): Physicochemical and biological properties of DNA and siRNA complexes. *J Control Release* **149**, 146-158 (2011).
126. Dou, H., *et al.* Macrophage delivery of nanoformulated antiretroviral drug to the brain in a murine model of neuroAIDS. *J Immunol* **183**, 661-669 (2009).
127. Borgmann, K., Rao, K.S., Labhasetwar, V. & Ghorpade, A. Efficacy of Tat-conjugated ritonavir-loaded nanoparticles in reducing HIV-1 replication in

- monocyte-derived macrophages and cytocompatibility with macrophages and human neurons. *AIDS Res Hum Retroviruses* **27**, 853-862 (2011).
128. Mahajan, S.D., *et al.* Enhancing the delivery of anti retroviral drug "Saquinavir" across the blood brain barrier using nanoparticles. *Curr HIV Res* **8**, 396-404 (2010).
129. Friedman, S.H., Ganapathi, P.S., Rubin, Y. & Kenyon, G.L. Optimizing the binding of fullerene inhibitors of the HIV-1 protease through predicted increases in hydrophobic desolvation. *J Med Chem* **41**, 2424-2429 (1998).
130. Bosi, S., Da Ros, T., Spalluto, G., Balzarini, J. & Prato, M. Synthesis and anti-HIV properties of new water-soluble bis-functionalized[60]fullerene derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* **13**, 4437-4440 (2003).
131. Durdagi, S., *et al.* In silico drug screening approach for the design of magic bullets: a successful example with anti-HIV fullerene derivatized amino acids. *J Chem Inf Model* **49**, 1139-1143 (2009).
132. Blanzat, M., *et al.* Dendritic catanionic assemblies: in vitro anti-HIV activity of phosphorus-containing dendrimers bearing galbeta1cer analogues. *Chembiochem* **6**, 2207-2213 (2005).
133. Gonzalo, T., *et al.* Gene therapy in HIV-infected cells to decrease viral impact by using an alternative delivery method. *ChemMedChem* **5**, 921-929 (2010).
134. Pion, M., *et al.* Phenotype and functional analysis of human monocytes-derived dendritic cells loaded with a carbosilane dendrimer. *Biomaterials* **31**, 8749-8758 (2010).
135. Song, E., *et al.* Antibody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors. *Nat Biotechnol* **23**, 709-717 (2005).
136. Liu, Z., Winters, M., Holodniy, M. & Dai, H. siRNA delivery into human T cells and primary cells with carbon-nanotube transporters. *Angew Chem Int Ed Engl* **46**, 2023-2027 (2007).
137. Weber, N., *et al.* Characterization of carbosilane dendrimers as effective carriers of siRNA to HIV-infected lymphocytes. *J Control Release* **132**, 55-64 (2008).
138. Weber, N.D., Merkel, O.M., Kissel, T. & Munoz-Fernandez, M.A. PEGylated poly(ethylene imine) copolymer-delivered siRNA inhibits HIV replication in vitro. *J Control Release* **157**, 55-63 (2012).
139. Lori, F., Calarota, S.A. & Lisiewicz, J. Nanochemistry-based immunotherapy for HIV-1. *Curr Med Chem* **14**, 1911-1919 (2007).
140. Aline, F., *et al.* Dendritic cells loaded with HIV-1 p24 proteins adsorbed on surfactant-free anionic PLA nanoparticles induce enhanced cellular immune responses against HIV-1 after vaccination. *Vaccine* **27**, 5284-5291 (2009).
141. Dykes, G.M., Brierley, L.J., Smith, D.K., McGrail, P.T. & Seeley, G.J. Supramolecular solubilisation of hydrophilic dyes by using individual dendritic branches. *Chemistry* **7**, 4730-4739 (2001).
142. du Toit, L.C., Pillay, V. & Choonara, Y.E. Nano-microbicides: challenges in drug delivery, patient ethics and intellectual property in the war against HIV/AIDS. *Adv Drug Deliv Rev* **62**, 532-546 (2010).
143. Svenson, S. & Tomalia, D.A. Dendrimers in biomedical applications--reflections on the field. *Adv Drug Deliv Rev* **57**, 2106-2129 (2005).
144. Oka, H., *et al.* Syntheses and biological evaluations of carbosilane dendrimers uniformly functionalized with sialyl alpha(2-->3) lactose moieties as inhibitors for human influenza viruses. *Bioorg Med Chem* **17**, 5465-5475 (2009).

145. Razinkov, V., Gazumyan, A., Nikitenko, A., Ellestad, G. & Krishnamurthy, G. RFI-641 inhibits entry of respiratory syncytial virus via interactions with fusion protein. *Chem Biol* **8**, 645-659 (2001).
146. Macri, R.V., *et al.* Comparing anti-HIV, antibacterial, antifungal, micellar, and cytotoxic properties of tricarboxylate dendritic amphiphiles. *Bioorg Med Chem* **17**, 3162-3168 (2009).
147. Gajbhiye, V., Palanirajan, V.K., Tekade, R.K. & Jain, N.K. Dendrimers as therapeutic agents: a systematic review. *J Pharm Pharmacol* **61**, 989-1003 (2009).
148. Nel, A.E., *et al.* Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat Mater* **8**, 543-557 (2009).
149. Pirrone, V., Wigdahl, B. & Krebs, F.C. The rise and fall of polyanionic inhibitors of the human immunodeficiency virus type 1. *Antiviral Res* **90**, 168-182 (2011).
150. Tsai, C.C., *et al.* Prevention of SIV infection in macaques by (R)-9-(2-phosphonylmethoxypropyl)adenine. *Science* **270**, 1197-1199 (1995).
151. Mayer, K.H., *et al.* Safety and tolerability of tenofovir vaginal gel in abstinent and sexually active HIV-infected and uninfected women. *AIDS* **20**, 543-551 (2006).
152. Cutler, B. & Justman, J. Vaginal microbicides and the prevention of HIV transmission. *Lancet Infect Dis* **8**, 685-697 (2008).
153. Abdool Karim, Q., *et al.* Effectiveness and safety of tenofovir gel, an antiretroviral microbicide, for the prevention of HIV infection in women. *Science* **329**, 1168-1174 (2010).
154. Di Fabio, S., *et al.* Inhibition of vaginal transmission of HIV-1 in hu-SCID mice by the non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor TMC120 in a gel formulation. *AIDS* **17**, 1597-1604 (2003).
155. Maeda, K., *et al.* The current status of, and challenges in, the development of CCR5 inhibitors as therapeutics for HIV-1 infection. *Curr Opin Pharmacol* **4**, 447-452 (2004).
156. Veazey, R.S., *et al.* Protection of macaques from vaginal SHIV challenge by vaginally delivered inhibitors of virus-cell fusion. *Nature* **438**, 99-102 (2005).
157. Lin, P.F., *et al.* A small molecule HIV-1 inhibitor that targets the HIV-1 envelope and inhibits CD4 receptor binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 11013-11018 (2003).
158. Guo, Q., *et al.* Biochemical and genetic characterizations of a novel human immunodeficiency virus type 1 inhibitor that blocks gp120-CD4 interactions. *J Virol* **77**, 10528-10536 (2003).
159. Veazey, R.S., *et al.* Protection of rhesus macaques from vaginal infection by vaginally delivered maraviroc, an inhibitor of HIV-1 entry via the CCR5 co-receptor. *J Infect Dis* **202**, 739-744 (2010).
160. Roddy, R.E., *et al.* A controlled trial of nonoxynol 9 film to reduce male-to-female transmission of sexually transmitted diseases. *N Engl J Med* **339**, 504-510 (1998).
161. Van Damme, L., *et al.* Effectiveness of COL-1492, a nonoxynol-9 vaginal gel, on HIV-1 transmission in female sex workers: a randomised controlled trial. *Lancet* **360**, 971-977 (2002).
162. Bourinbaier, A.S. & Fruhstorfer, E.C. The efficacy of nonoxynol-9 from an in vitro point of view. *AIDS* **10**, 558-559 (1996).
163. Hicks, D.R., *et al.* Inactivation of HTLV-III/LAV-infected cultures of normal human lymphocytes by nonoxynol-9 in vitro. *Lancet* **2**, 1422-1423 (1985).

164. Miller, C.J., Alexander, N.J., Gettie, A., Hendrickx, A.G. & Marx, P.A. The effect of contraceptives containing nonoxynol-9 on the genital transmission of simian immunodeficiency virus in rhesus macaques. *Fertil Steril* **57**, 1126-1128 (1992).
165. Stafford, M.K., *et al.* Safety study of nonoxynol-9 as a vaginal microbicide: evidence of adverse effects. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* **17**, 327-331 (1998).
166. Calis, S., Yulug, N., Sumnu, M., Ayhan, A. & Hincal, A.A. A non-antibiotic antimicrobial mixture (C31G): evaluation of the antimicrobial efficiency of C31G on vaginal cultures. *Boll Chim Farm* **131**, 335-338 (1992).
167. Thompson, K.A., Malamud, D. & Storey, B.T. Assessment of the anti-microbial agent C31G as a spermicide: comparison with nonoxynol-9. *Contraception* **53**, 313-318 (1996).
168. Wyrick, P.B., *et al.* The microbicidal agent C31G inhibits Chlamydia trachomatis infectivity in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* **41**, 1335-1344 (1997).
169. Krebs, F.C., Miller, S.R., Malamud, D., Howett, M.K. & Wigdahl, B. Inactivation of human immunodeficiency virus type 1 by nonoxynol-9, C31G, or an alkyl sulfate, sodium dodecyl sulfate. *Antiviral Res* **43**, 157-173 (1999).
170. Bax, R., *et al.* Microbicides--evaluating multiple formulations of C31G. *Contraception* **66**, 365-368 (2002).
171. Ballagh, S.A., Baker, J.M., Henry, D.M. & Archer, D.F. Safety of single daily use for one week of C31G HEC gel in women. *Contraception* **66**, 369-375 (2002).
172. Mauck, C.K., *et al.* A randomized Phase I vaginal safety study of three concentrations of C31G vs. Extra Strength Gynol II. *Contraception* **70**, 233-240 (2004).
173. Feldblum, P.J., *et al.* SAVVY vaginal gel (C31G) for prevention of HIV infection: a randomized controlled trial in Nigeria. *PLoS One* **3**, e1474 (2008).
174. Bestman-Smith, J., *et al.* Sodium lauryl sulfate abrogates human immunodeficiency virus infectivity by affecting viral attachment. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 2229-2237 (2001).
175. Mbopi-Keou, F.X., *et al.* A randomized, double-blind, placebo-controlled Phase II extended safety study of two Invisible Condom formulations in Cameroonian women. *Contraception* **81**, 79-85 (2010).
176. Martin, L.S., McDougal, J.S. & Loskoski, S.L. Disinfection and inactivation of the human T lymphotropic virus type III/Lymphadenopathy-associated virus. *J Infect Dis* **152**, 400-403 (1985).
177. Ongradi, J., Ceccherini-Nelli, L., Pistello, M., Specter, S. & Bendinelli, M. Acid sensitivity of cell-free and cell-associated HIV-1: clinical implications. *AIDS Res Hum Retroviruses* **6**, 1433-1436 (1990).
178. O'Connor, T.J., Kinchington, D., Kangro, H.O. & Jeffries, D.J. The activity of candidate virucidal agents, low pH and genital secretions against HIV-1 in vitro. *Int J STD AIDS* **6**, 267-272 (1995).
179. Olmsted, S.S., Dubin, N.H., Cone, R.A. & Moench, T.R. The rate at which human sperm are immobilized and killed by mild acidity. *Fertil Steril* **73**, 687-693 (2000).
180. Croughan, W.S. & Behbehani, A.M. Comparative study of inactivation of herpes simplex virus types 1 and 2 by commonly used antiseptic agents. *J Clin Microbiol* **26**, 213-215 (1988).

181. van De Wijgert, J., *et al.* Phase 1 trial of the topical microbicide BufferGel: safety results from four international sites. *J Acquir Immune Defic Syndr* **26**, 21-27 (2001).
182. Mayer, K.H., *et al.* Safety and tolerability of BufferGel, a novel vaginal microbicide, in women in the United States. *Clin Infect Dis* **32**, 476-482 (2001).
183. Abdool Karim, S.S., *et al.* Safety and effectiveness of BufferGel and 0.5% PRO2000 gel for the prevention of HIV infection in women. *AIDS* **25**, 957-966 (2011).
184. Klebanoff, S.J. & Coombs, R.W. Viricidal effect of *Lactobacillus acidophilus* on human immunodeficiency virus type 1: possible role in heterosexual transmission. *J Exp Med* **174**, 289-292 (1991).
185. Martin, H.L., *et al.* Vaginal lactobacilli, microbial flora, and risk of human immunodeficiency virus type 1 and sexually transmitted disease acquisition. *J Infect Dis* **180**, 1863-1868 (1999).
186. Patton, D.L., Cosgrove Sweeney, Y.T., Antonio, M.A., Rabe, L.K. & Hillier, S.L. *Lactobacillus crispatus* capsules: single-use safety study in the Macaca nemestrina model. *Sex Transm Dis* **30**, 568-570 (2003).
187. Antonio, M.A. & Hillier, S.L. DNA fingerprinting of *Lactobacillus crispatus* strain CTV-05 by repetitive element sequence-based PCR analysis in a pilot study of vaginal colonization. *J Clin Microbiol* **41**, 1881-1887 (2003).
188. Lagenaur, L.A., *et al.* Prevention of vaginal SHIV transmission in macaques by a live recombinant *Lactobacillus*. *Mucosal Immunol* **4**, 648-657 (2011).
189. Balzarini, J. & Van Damme, L. Microbicide drug candidates to prevent HIV infection. *Lancet* **369**, 787-797 (2007).
190. Mitsuya, H., *et al.* Dextran sulfate suppression of viruses in the HIV family: inhibition of virion binding to CD4+ cells. *Science* **240**, 646-649 (1988).
191. Schols, D., Pauwels, R., Desmyter, J. & De Clercq, E. Dextran sulfate and other polyanionic anti-HIV compounds specifically interact with the viral gp120 glycoprotein expressed by T-cells persistently infected with HIV-1. *Virology* **175**, 556-561 (1990).
192. Moulard, M., *et al.* Selective interactions of polyanions with basic surfaces on human immunodeficiency virus type 1 gp120. *J Virol* **74**, 1948-1960 (2000).
193. Keller, M.J., *et al.* PRO 2000 gel inhibits HIV and herpes simplex virus infection following vaginal application: a double-blind placebo-controlled trial. *J Infect Dis* **193**, 27-35 (2006).
194. Weber, J., *et al.* 'Chemical condoms' for the prevention of HIV infection: evaluation of novel agents against SHIV(89.6PD) in vitro and in vivo. *AIDS* **15**, 1563-1568 (2001).
195. Van Damme, L., *et al.* A phase I study of a novel potential intravaginal microbicide, PRO 2000, in healthy sexually inactive women. *Sex Transm Infect* **76**, 126-130 (2000).
196. Mayer, K.H., *et al.* Safety and tolerability of vaginal PRO 2000 gel in sexually active HIV-uninfected and abstinent HIV-infected women. *AIDS* **17**, 321-329 (2003).
197. Joshi, S., *et al.* Documenting intermenstrual bleeding in a vaginal microbicide study: case reports and lessons learned. *AIDS Res Hum Retroviruses* **22**, 294-296 (2006).
198. Perotti, M.E., Pirovano, A. & Phillips, D.M. Carrageenan formulation prevents macrophage trafficking from vagina: implications for microbicide development. *Biol Reprod* **69**, 933-939 (2003).

199. Coggins, C., *et al.* Preliminary safety and acceptability of a carrageenan gel for possible use as a vaginal microbicide. *Sex Transm Infect* **76**, 480-483 (2000).
200. Pistorius, A.G., *et al.* Microbicide trials for preventing HIV/AIDS in South Africa: phase II trial participants' experiences and psychological needs. *SAHARA J* **1**, 78-86 (2004).
201. Kilmarx, P.H., *et al.* Safety and acceptability of the candidate microbicide Carraguard in Thai Women: findings from a Phase II Clinical Trial. *J Acquir Immune Defic Syndr* **43**, 327-334 (2006).
202. van de Wijgert, J.H., *et al.* Carraguard Vaginal Gel Safety in HIV-Positive Women and Men in South Africa. *J Acquir Immune Defic Syndr* **46**, 538-546 (2007).
203. Bollen, L.J., *et al.* No increase in cervicovaginal proinflammatory cytokines after Carraguard use in a placebo-controlled randomized clinical trial. *J Acquir Immune Defic Syndr* **47**, 253-257 (2008).
204. Expanded safety and acceptability of the candidate vaginal microbicide Carraguard(R) in South Africa. *Contraception* **82**, 563-571 (2010).
205. Su, H. & Caldwell, H.D. Sulfated polysaccharides and a synthetic sulfated polymer are potent inhibitors of Chlamydia trachomatis infectivity in vitro but lack protective efficacy in an in vivo murine model of chlamydial genital tract infection. *Infect Immun* **66**, 1258-1260 (1998).
206. Christensen, N.D., *et al.* Papillomavirus microbicidal activities of high-molecular-weight cellulose sulfate, dextran sulfate, and polystyrene sulfonate. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 3427-3432 (2001).
207. Simoes, J.A., *et al.* Two novel vaginal microbicides (polystyrene sulfonate and cellulose sulfate) inhibit Gardnerella vaginalis and anaerobes commonly associated with bacterial vaginosis. *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 2692-2695 (2002).
208. Anderson, R.A., *et al.* Preclinical evaluation of sodium cellulose sulfate (Ushercell) as a contraceptive antimicrobial agent. *J Androl* **23**, 426-438 (2002).
209. Neurath, A.R., Strick, N. & Li, Y.Y. Anti-HIV-1 activity of anionic polymers: a comparative study of candidate microbicides. *BMC Infect Dis* **2**, 27 (2002).
210. Scordi-Bello, I.A., *et al.* Candidate sulfonated and sulfated topical microbicides: comparison of anti-human immunodeficiency virus activities and mechanisms of action. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 3607-3615 (2005).
211. Mauck, C., *et al.* Single and multiple exposure tolerance study of cellulose sulfate gel: a Phase I safety and colposcopy study. *Contraception* **64**, 383-391 (2001).
212. Mauck, C., Frezieres, R., Walsh, T., Robergeau, K. & Callahan, M. Cellulose sulfate: tolerance and acceptability of penile application. *Contraception* **64**, 377-381 (2001).
213. Malonza, I.M., *et al.* Expanded Phase I safety and acceptability study of 6% cellulose sulfate vaginal gel. *AIDS* **19**, 2157-2163 (2005).
214. El-Sadr, W.M., *et al.* Safety and acceptability of cellulose sulfate as a vaginal microbicide in HIV-infected women. *AIDS* **20**, 1109-1116 (2006).
215. Schwartz, J.L., *et al.* Fourteen-day safety and acceptability study of 6% cellulose sulfate gel: a randomized double-blind Phase I safety study. *Contraception* **74**, 133-140 (2006).
216. Jespers, V., Buve, A. & Van Damme, L. Safety trial of the vaginal microbicide cellulose sulfate gel in HIV-positive men. *Sex Transm Dis* **34**, 519-522 (2007).



217. Halpern, M.T., Dirani, R. & Schmier, J.K. The cost effectiveness of varenicline for smoking cessation. *Manag Care Interface* **20**, 18-25 (2007).
218. Van Damme, L., *et al.* Lack of effectiveness of cellulose sulfate gel for the prevention of vaginal HIV transmission. *N Engl J Med* **359**, 463-472 (2008).
219. Pirrone, V., Passic, S., Wigdahl, B. & Krebs, F.C. Application and removal of polyanionic microbicide compounds enhances subsequent infection by HIV-1. *Viol J* **9**, 33 (2012).
220. Bernstein, D.I., *et al.* Evaluations of unformulated and formulated dendrimer-based microbicide candidates in mouse and guinea pig models of genital herpes. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 3784-3788 (2003).
221. Jiang, Y.H., *et al.* SPL7013 gel as a topical microbicide for prevention of vaginal transmission of SHIV89.6P in macaques. *AIDS Res Hum Retroviruses* **21**, 207-213 (2005).
222. Gong, E., *et al.* Evaluation of dendrimer SPL7013, a lead microbicide candidate against herpes simplex viruses. *Antiviral Res* **68**, 139-146 (2005).
223. Tyssen, D., *et al.* Structure activity relationship of dendrimer microbicides with dual action antiviral activity. *PLoS One* **5**, e12309 (2010).
224. Rupp, R., Rosenthal, S.L. & Stanberry, L.R. VivaGel (SPL7013 Gel): a candidate dendrimer--microbicide for the prevention of HIV and HSV infection. *Int J Nanomedicine* **2**, 561-566 (2007).
225. McGowan, I., *et al.* Phase 1 randomized trial of the vaginal safety and acceptability of SPL7013 gel (VivaGel) in sexually active young women (MTN-004). *AIDS* **25**, 1057-1064 (2011).
226. McCarthy, T.D., *et al.* Dendrimers as drugs: discovery and preclinical and clinical development of dendrimer-based microbicides for HIV and STI prevention. *Mol Pharm* **2**, 312-318 (2005).
227. Telwatte, S., *et al.* Virucidal activity of the dendrimer microbicide SPL7013 against HIV-1. *Antiviral Res* **90**, 195-199 (2011).
228. Price, C.F., *et al.* SPL7013 Gel (VivaGel(R)) retains potent HIV-1 and HSV-2 inhibitory activity following vaginal administration in humans. *PLoS One* **6**, e24095 (2011).
229. Lackman-Smith, C., *et al.* Development of a comprehensive human immunodeficiency virus type 1 screening algorithm for discovery and preclinical testing of topical microbicides. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 1768-1781 (2008).
230. Moscicki, A.B., *et al.* Measurement of mucosal biomarkers in a phase 1 trial of intravaginal 3% StarPharma LTD 7013 gel (VivaGel) to assess expanded safety. *J Acquir Immune Defic Syndr* **59**, 134-140 (2012).
231. Hollinger, F.B., Bremer, J.W., Myers, L.E., Gold, J.W. & McQuay, L. Standardization of sensitive human immunodeficiency virus coculture procedures and establishment of a multicenter quality assurance program for the AIDS Clinical Trials Group. The NIH/NIAID/DAIDS/ACTG Virology Laboratories. *J Clin Microbiol* **30**, 1787-1794 (1992).
232. Japour, A.J., *et al.* Standardized peripheral blood mononuclear cell culture assay for determination of drug susceptibilities of clinical human immunodeficiency virus type 1 isolates. The RV-43 Study Group, the AIDS Clinical Trials Group

- Virology Committee Resistance Working Group. *Antimicrob Agents Chemother* **37**, 1095-1101 (1993).
233. Delgado, E., *et al.* Evaluation of genotypic tropism prediction tests compared with in vitro co-receptor usage in HIV-1 primary isolates of diverse subtypes. *J Antimicrob Chemother* **67**, 25-31 (2012).
234. Cuevas, M.T., *et al.* Short communication: Biological and genetic characterization of HIV type 1 subtype B and nonsubtype B transmitted viruses: usefulness for vaccine candidate assessment. *AIDS Res Hum Retroviruses* **26**, 1019-1025 (2010).
235. Fernandez-Garcia, A., *et al.* Development of a panel of well-characterized human immunodeficiency virus type 1 isolates from newly diagnosed patients including acute and recent infections. *AIDS Res Hum Retroviruses* **25**, 93-102 (2009).
236. Hong-Chang Liang , S.K.D., Juan R. Galvan , Suzanne M. Sato , Yonglian Zhang , Lev N. Zakharov and Arnold L. Rheingold. Syntheses of water-soluble N-donor ligands for aqueous catalysis using green, Michael-type addition reactions. *Green Chem* **7**, 410-412 (2005).
237. de la Mata, F., Sánchez-Nieves, J., Ortega, P., Gómez, R., Muñoz-Fernández, MA., Chonco, L., and Serramía, MJ. Dendrímeros carbosilano con un núcleo polifenólico y su uso como antivirales. *Oficina de patentes y marcas* **201030450**(2010).
238. de la Mata, F., Sánchez-Nieves, J., Rasines, B., Arnaiz, E., Serramía, MJ., Gómez, R., Chonco, L., and Muñoz-Fernández, MA. Dendrímeros carbosilano y su uso como antivirales. *Oficina de patentes y marcas* **PCT/ES2011/0701**(2011).
239. Armand-Ugon, M., *et al.* Reduced fitness of HIV-1 resistant to CXCR4 antagonists. *Antivir Ther* **8**, 1-8 (2003).
240. De Clercq, E. New developments in anti-HIV chemotherapy. *Biochim Biophys Acta* **1587**, 258-275 (2002).
241. Critchlow, J.D., *et al.* Quality control in an in-vitro fertilization laboratory: use of human sperm survival studies. *Hum Reprod* **4**, 545-549 (1989).
242. Claassens, O.E., Wehr, J.B. & Harrison, K.L. Optimizing sensitivity of the human sperm motility assay for embryo toxicity testing. *Hum Reprod* **15**, 1586-1591 (2000).
243. De Jonge, C.J., *et al.* Human sperm survival assay as a bioassay for the assisted reproductive technologies laboratory. *J Androl* **24**, 16-18 (2003).
244. Iemmolo, M., Simmons, L. & Matson, P. The rapid detection of cytotoxicity using a modified human sperm survival assay. *J Assist Reprod Genet* **22**, 177-180 (2005).
245. Ryckaert, J.P., Ciccotti, G. & Berendsen, J.C. Numerical integration of the Cartesian Equations of Motion of a System with Constraints: Molecular Dynamics of n-Alkanes. *J Comput Phys* **23**, 321-341 (1977).
246. Wu, X. & Brooks, B.R. Self-guided langevin dynamics simulation method. *J Amer Chem Soc* **120**, 512-518 (2003).
247. Srinivasan, J., Miller, J., Kollman, P.A. & Case, D.A. Continuum solvent studies of the stability of RNA hairpin loops and helices. *J Biomol Struct Dyn* **16**, 671-682 (1998).
248. Gali, Y., *et al.* Development of an in vitro dual-chamber model of the female genital tract as a screening tool for epithelial toxicity. *J Virol Methods* **165**, 186-197 (2010).
249. Gras, R., *et al.* Changes in gene expression pattern of human primary macrophages induced by carbosilane dendrimer 2G-NN16. *Pharm Res* **26**, 577-586 (2009).

250. Brazma, A., *et al.* Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat Genet* **29**, 365-371 (2001).
251. Smyth, G.K. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* **3**, Article3 (2004).
252. Eckstein, P., Jackson, M.C., Millman, N. & Sobrero, A.J. Comparison of vaginal tolerance tests of spermicidal preparations in rabbits and monkeys. *J Reprod Fertil* **20**, 85-93 (1969).
253. Guenther, P.C., Secor, W.E. & Dezzutti, C.S. Trichomonas vaginalis-induced epithelial monolayer disruption and human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication: implications for the sexual transmission of HIV-1. *Infect Immun* **73**, 4155-4160 (2005).
254. Mesquita, P.M., *et al.* Disruption of tight junctions by cellulose sulfate facilitates HIV infection: model of microbicide safety. *J Infect Dis* **200**, 599-608 (2009).
255. Gali, Y., *et al.* In vitro evaluation of viability, integrity, and inflammation in genital epithelia upon exposure to pharmaceutical excipients and candidate microbicides. *Antimicrob Agents Chemother* **54**, 5105-5114 (2010).
256. Meylan, P.R., Kornbluth, R.S., Zbinden, I. & Richman, D.D. Influence of host cell type and V3 loop of the surface glycoprotein on susceptibility of human immunodeficiency virus type 1 to polyanion compounds. *Antimicrob Agents Chemother* **38**, 2910-2916 (1994).
257. Nazli, A., *et al.* Exposure to HIV-1 directly impairs mucosal epithelial barrier integrity allowing microbial translocation. *PLoS Pathog* **6**, e1000852 (2010).
258. Sandra García-Gallego, M.J.S., Eduardo Arnaiz, Laura Díaz, M. Angeles Muñoz-Fernández, Pilar Gómez-Sal, M. Francesca Ottaviani, Rafael Gómez, F. Javier de la Mata. Transition-Metal Complexes Based on a Sulfonate-Containing N-Donor Ligand and Their Use as HIV Antiviral Agents. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2011**, 1657–1665 (2011).
259. De Clercq, E. Antiviral therapy for human immunodeficiency virus infections. *Clin Microbiol Rev* **8**, 200-239 (1995).
260. Ray, N. & Doms, R.W. HIV-1 coreceptors and their inhibitors. *Curr Top Microbiol Immunol* **303**, 97-120 (2006).
261. Pedziwiatr, E., *et al.* Binding properties of water-soluble carbosilane dendrimers. *J Fluoresc* **19**, 267-275 (2009).
262. Buckheit, R.W., Jr. & Buckheit, K.W. An algorithm for the preclinical development of anti-HIV topical microbicides. *Curr HIV Res* **10**, 97-104 (2012).
263. Bergstrom, D.E., *et al.* Polysulfonates derived from metal thiolate complexes as inhibitors of HIV-1 and various other enveloped viruses in vitro. *Antivir Chem Chemother* **13**, 185-195 (2002).
264. D'Cruz, O.J., Dong, Y. & Uckun, F.M. Potent dual anti-HIV and spermicidal activities of novel oxovanadium(V) complexes with thiourea non-nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase. *Biochem Biophys Res Commun* **302**, 253-264 (2003).
265. Lebon, F., *et al.* Metal-organic compounds: a new approach for drug discovery. N1-(4-methyl-2-pyridyl)-2,3,6-trimethoxybenzamide copper(II) complex as an inhibitor of human immunodeficiency virus 1 protease. *Biochem Pharmacol* **63**, 1863-1873 (2002).
266. Rissing, C. & Son, D.Y. Application of Thiol-Ene Chemistry to the Preparation of Carbosilane-Thioether Dendrimers. *Organometallics* **28**, 3167–3172 (2009).

267. Dezzutti, C.S., *et al.* In vitro comparison of topical microbicides for prevention of human immunodeficiency virus type 1 transmission. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 3834-3844 (2004).
268. Farage, M.A. & Maibach, H.I. Morphology and physiological changes of genital skin and mucosa. *Curr Probl Dermatol* **40**, 9-19 (2011).
269. Anton, P.A. Future prospects and perspectives on microbicides. *Curr HIV Res* **10**, 113-115 (2012).
270. Quinones-Mateu, M.E. & Vanham, G. HIV microbicides: where are we now? *Curr HIV Res* **10**, 1-2 (2012).
271. Keller, M.J., *et al.* Postcoital bioavailability and antiviral activity of 0.5% PRO 2000 gel: implications for future microbicide clinical trials. *PLoS One* **5**, e8781 (2010).
272. Lara, H.H., Ayala-Nunez, N.V., Ixtapan-Turrent, L. & Rodriguez-Padilla, C. Mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1. *J Nanobiotechnology* **8**, 1 (2010).
273. Ham, A.S., Cost, M.R., Sassi, A.B., Dezzutti, C.S. & Rohan, L.C. Targeted delivery of PSC-RANTES for HIV-1 prevention using biodegradable nanoparticles. *Pharm Res* **26**, 502-511 (2009).
274. Gibson, R.M. & Arts, E.J. Past, present, and future of entry inhibitors as HIV microbicides. *Curr HIV Res* **10**, 19-26 (2012).
275. Kwa, D., Vingerhoed, J., Boeser, B. & Schuitemaker, H. Increased in vitro cytopathicity of CC chemokine receptor 5-restricted human immunodeficiency virus type 1 primary isolates correlates with a progressive clinical course of infection. *J Infect Dis* **187**, 1397-1403 (2003).
276. Scoggins, R.M., *et al.* Pathogenesis of primary R5 human immunodeficiency virus type 1 clones in SCID-hu mice. *J Virol* **74**, 3205-3216 (2000).
277. Repits, J., *et al.* Selection of human immunodeficiency virus type 1 R5 variants with augmented replicative capacity and reduced sensitivity to entry inhibitors during severe immunodeficiency. *J Gen Virol* **86**, 2859-2869 (2005).
278. Karlsson, I., *et al.* Coevolution of RANTES sensitivity and mode of CCR5 receptor use by human immunodeficiency virus type 1 of the R5 phenotype. *J Virol* **78**, 11807-11815 (2004).
279. Koning, F.A., *et al.* Decreasing sensitivity to RANTES (regulated on activation, normally T cell-expressed and -secreted) neutralization of CC chemokine receptor 5-using, non-syncytium-inducing virus variants in the course of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis* **188**, 864-872 (2003).
280. Fernandez, G., *et al.* Purifying selection of CCR5-tropic human immunodeficiency virus type 1 variants in AIDS subjects that have developed syncytium-inducing, CXCR4-tropic viruses. *J Gen Virol* **87**, 1285-1294 (2006).
281. Saïdi, H., Magri, G., Nasreddine, N., Réquena, M. & Bélec, L. R5- and X4-HIV-1 use differentially the endometrial epithelial cells HEC-1A to ensure their own spread: Implication for mechanisms of sexual transmission. *Virology* **358**, 55-68 (2007).
282. Chonco, L., *et al.* Carbosilane dendrimer nanotechnology outlines of the broad HIV blocker profile. *J Control Release* **161**, 949-958 (2012).
283. Dittmar, M.T., *et al.* Biological characterization of human immunodeficiency virus type 1 clones derived from different organs of an AIDS patient by long-range PCR. *J Virol* **71**, 5140-5147 (1997).

284. Princen, K., Hatse, S., Vermeire, K., De Clercq, E. & Schols, D. Establishment of a novel CCR5 and CXCR4 expressing CD4+ cell line which is highly sensitive to HIV and suitable for high-throughput evaluation of CCR5 and CXCR4 antagonists. *Retrovirology* **1**, 2 (2004).
285. Cohen, C.R., *et al.* A phase I randomized placebo controlled trial of the safety of 3% SPL7013 Gel (VivaGel(R)) in healthy young women administered twice daily for 14 days. *PLoS One* **6**, e16258 (2011).
286. Garg, S., *et al.* Advances in development, scale-up and manufacturing of microbicide gels, films, and tablets. *Antiviral Res* **88 Suppl 1**, S19-29 (2010).
287. Palella, F.J., Jr., *et al.* Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med* **338**, 853-860 (1998).
288. Huskens, D., Vermeire, K., Profy, A.T. & Schols, D. The candidate sulfonated microbicide, PRO 2000, has potential multiple mechanisms of action against HIV-1. *Antiviral Res* **84**, 38-47 (2009).
289. Shacklett, B.L. & Greenblatt, R.M. Immune responses to HIV in the female reproductive tract, immunologic parallels with the gastrointestinal tract, and research implications. *Am J Reprod Immunol* **65**, 230-241 (2011).
290. Grivel, J.C., Shattock, R.J. & Margolis, L.B. Selective transmission of R5 HIV-1 variants: where is the gatekeeper? *J Transl Med* **9 Suppl 1**, S6 (2011).